



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Diversität von psychrophilen sulfatreduzierenden und thermophilen sporenbildenden Mikroorganismen im arktischen Meeressediment vor Spitzbergen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:
Matrikel-Nummer:
Studienrichtung:
Betreuer:

Diana Lebherz-Eichinger
0102106
Ökologie und Naturschutz
o.Univ.Prof.Dr. Michael Wagner

Wien, im

Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	7
A.6. Sulfatreduzierende Mikroorganismen	7
A.6. Arktische Sedimente als Lebensraum am Beispiel von Svalbard	9
A.6. Ziele dieser Arbeit	12
B. Material und Methoden	13
B.1. Probennahme	13
B.1.1 Entnahme der Proben für die DsrAB-Stammbaumanalyse	13
B.1.2. Entnahme der Proben für die Inkubation des Sediments bei 50 °C	13
B.2. Allgemeine Materialien und Techniken	13
B.2.2. Öffentlich zugängliche Software	14
B.2.3. Technische Geräte	14
B.2.4. Verbrauchsmaterialien	15
B.2.5. Chemikalien	16
B.2.6. Molekularbiologische Kits zur Extraktion, Aufreinigung und Quantifizierung von DNS	17
B.2.7. Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen	17
B.2.8. Puffer, Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese	18
B.2.9. Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	19
B.2.10. Antibiotika-Lösungen	20
B.2.11. Lösungen für den Plasmid-Miniprep	20
B.3. Material und Methoden für die phylogenetisch Analyse von DsrAB- und 16S-rRNS-Sequenzen	21
B.3.1. Methoden der DNS-Isolierung aus Sediment	21
B.3.2. Quantitative und qualitative Untersuchung der extrahierten Nukleinsäuren	22
B.3.3. In vitro-Amplifizierung einzelner Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion	23
B.3.4. Klonierung von Gen-Amplifikaten	26
B.3.5. Sequenzierung von DNS-Molekülen	30
B.3.6. Schnellanalyse der Sequenzen	30
B.3.7. Vergleichende Sequenzanalyse mit dem ARB Software Paket	30
B.3.9. Automatisches und manuelles Alignment von Sequenzen	31
B.3.10. Nachweis chimärer Sequenzen	31
B.3.11. Phylogenie	32
B.3.12. Vergleich zweier Datenbanken	37
B.4. Material und Methoden zur Quantifizierung thermophiler sulfatreduzierender Prokaryoten	39
B.4.1. Inkubation des Sediments von Smeerenburgfjorden	39
B.4.2. Entwicklung und Austestung einer Methode zur Isolierung von DNS aus Sporen und vegetativen Zellen	39
B.4.3. Isolierung genomischer DNS aus inkubiertem Sediment	42
B.4.4. Allgemeine quantitative und qualitative Untersuchung der extrahierten Nukleinsäuren	43
B.4.5. Quantifizierung extrahierter Nukleinsäuren mittels PicoGreen®	43
B.4.6. Design von Primern und Austestung ihrer Spezifität für die quantitative Real-Time-PCR	43
B.4.7. Herstellung des Standards für die quantitative Real-Time-PCR	45
B.4.8. Quantitative Real-Time PCR	46
B.4.9. Analysen zur Ermittlung der Spezifität der qPCR	48
B.4.10. Analyse der Daten der qPCR	49
C. Ergebnisse	51
C.1. Phylogenie von SRM im arktischen Sediment vor Svalbard basierend auf vergleichender DsrAB-Sequenzanalyse	51
C.1.1. Isolierung, Amplifizierung sowie Klonierung und Sequenzierung genomischer DNS	51
C.1.2. Sequenzanalysen	51

C.1.3. Phylogenetische Analysen	53
C.1.3. Vergleich der <i>dsrAB</i> -Genbanken der Stationen AH und J	55
C.2. Phylogenie der mikrobiellen Diversität im arktischen Sediment vor Svalbard	
basierend auf vergleichender Sequenzanalyse der 16S-rRNS Gene	57
C.2.1. Sequenzanalysen	57
C.2.2. Phylogenetische Analyse der allgemeinen 16S-rRNS-Sequenzen	59
C.2.3. 16S-rRNS-basierende phylogenetische Analyse der Gattung <i>Desulfotomaculum</i>	62
C.2.4. Vergleich der 16S-rRNS-Genbanken nach 20 und 80 Stunden Inkubation	64
C.3. Quantifizierung thermophiler sporenbildender SRM.....	65
C.3.2. Entwicklung und Evaluierung einer Methode	
zur Isolierung von DNS aus Sporen und vegetativen Zellen	65
C.3.3. Isolierung der DNS aus Sediment, anschließende PCR und	
Bestimmung der DNS-Konzentration.....	68
C.3.3 Design von Primern und Austestung ihrer Spezifität für die qPCR.....	69
C.3.4. Ermittlung der Spezifität der qPCR	70
C.3.5. Quantifizierung der DNS-Matrizen der Inkubationen JV-2 und S4.....	72
D. Diskussion	75
D.1. DsrAB-basierende Phylogenie von SRM im arktischen Sediment vor Svalbard.	75
D.4. 16S-rRNS-basierende Phylogenie der mikrobiellen Diversität im arktischen	
Sediment vor Svalbard	78
D.3. Abundanz thermophiler sporenbildender SRM in zwei Inkubationen von	
arktischem Sediment bei 50 °C	79
D.4. Auswirkung initialer Substratzugabe auf bakterielles Wachstum.....	83
D.5. Änderung der Substratkonzentrationen im zeitlichen Verlauf der Inkubation	
von arktischem Sediment bei 50 °C.....	85
E. Zusammenfassung	87
F. Summary	88
G. Literaturverzeichnis	89
H. Abkürzungsverzeichnis	98
I. Anhang	100
J. Abgrenzung der Eigenleistung.....	116
K. Danksagung	117
L. Curriculum vitae	119

A. Einleitung

A.6. Sulfatreduzierende Mikroorganismen

Die mikrobielle Sulfatreduktion stellt aufgrund der thermodynamischen Stabilität von Sulfat, welches die häufigste Form von Schwefel in der oxischen Biosphäre bildet, die Basis des biologischen Schwefelkreislaufs dar (Henrichs und Reeburgh 1987; Jørgensen 1987, Skyring 1987, Widdel 1988) (Abbildung A.1).

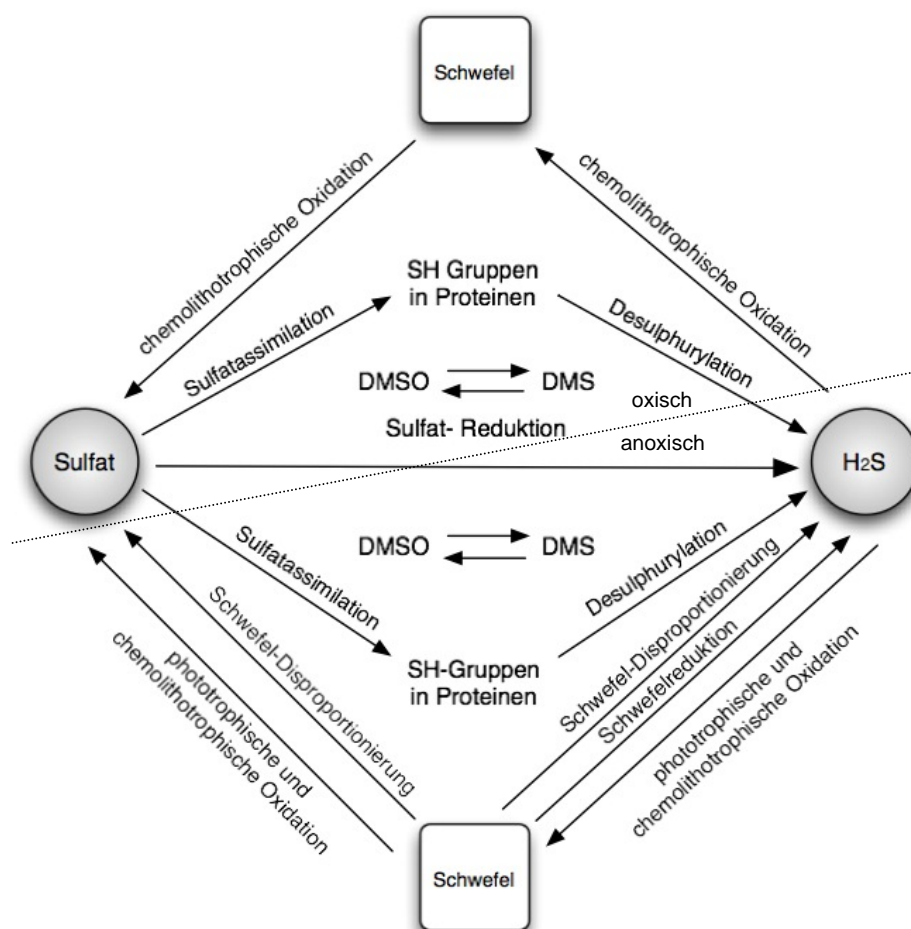


Abbildung A.1: Schema des biochemischen Schwefelkreislaufs: Sulfid wird aerob chemolithotroph oder anaerob auch phototroph zu Schwefel oxidiert, welcher weiter zu Sulfat oxidiert, bzw. wieder reduziert wird. Disproportionierung und Dismutierung (bildung zweier chemischer Verbindungen, von denen einer höher oxidiert, der andere höher reduziert ist als der Ausgangsstoff) stellen eine weitere Transformation im Kreislauf dar. Organische Verbindungen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) können in Dimethylsulfid (DMS) umgewandelt werden. (Muyzer und Stams 2008, modifiziert)

Es gibt zwei Formen der Sulfatreduktion: bei der dissimilatorischen dient Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor und wird zu Sulfid umgewandelt, welches ausgeschieden wird, während bei der assimilatorischen Sulfatreduktion Sulfat in organische Verbindungen umgewandelt wird (Madigan *et al.* 2000). Das Schlüsselenzym der dissimilatorischen Sulfatreduktion ist die dissimilatorische Sulfit-Reduktase (DSR), welche den letzten Schritt, nämlich die Reduktion von Sulfit zu Sulfid katalysiert (Odom und Peck 1984). Die Verteilung der zugrunde liegenden *dsrAB*-Gene unter den sulfatreduzierenden Mikroorganismen (SRM) kann sowohl durch vertikale Vererbung als auch durch horizontalen Gentransfer zwischen entfernten Verwandten erklärt werden.

SRM sind anaerobe Mikroorganismen, welche ubiquitär in der Umwelt vorkommen und selbst bei extremen Bedingungen wachsen können. Einige Vertreter sind sogar in der Lage durch protektive Abwehrmechanismen Sauerstoff zu tolerieren (Minz *et al.* 1999; Abreu *et al.* 2000; Cypionka 2000; Baumgarten *et al.* 2001; Silva *et al.* 2001a; Silva *et al.* 2001b). Manche SRM wurden als potentiell humanpathogene Mikroorganismen identifiziert. So können Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* asymptomatisch im menschlichen Gastrointestinaltrakt vorliegen, aber auch als opportunistische Pathogene mit Krankheitsbildern wie primärer Bakteriämie (Urata *et al.* 2008), Sepsis (Porschen und Chan 1977; Goldstein *et al.* 2003), Periodontitis (Loubinoux *et al.* 2000), Gehirnabszessen (Lozniewski *et al.* 1999; Loubinoux *et al.* 2000), Meningoencephalitis (La Scola und Raoult 1999) oder abdominalen Infektionen wie Appendizitis (Loubinoux *et al.* 2000), Cholezystitis (Porschen und Chan 1977), Choledocholithiasis (Pimentel und Chan 2007) sowie Abdominal- (Johnson und Finegold 1987; Loubinoux *et al.* 2000) und Leberabszessen (Tee *et al.* 1996) in Zusammenhang gebracht werden.

Als potentielle Elektronendonoren dienen SRM zur Energiegewinnung eine Vielzahl von Substraten, hauptsächlich jedoch molekularer Wasserstoff (H₂), Laktat, Succinat, Azetat und Pyruvat (Madigan *et al.* 2000). Des Weiteren leisten manche SRM durch die Verwertung von Xenobiotika (Krumholz *et al.* 1999; Sung *et al.* 2003), Nebenprodukten von Erdöl (Hansen 1994; Kniemeyer *et al.* 2003) und anderen umwelttoxische Substanzen (Abdelouas *et al.* 2000; Castro *et al.* 2002; Noh *et al.* 2003) als Substrate, einen wichtigen Beitrag zur Biodegradation von Verschmutzungen in terrestrischen Habitaten.

A.6. Arktische Sedimente als Lebensraum am Beispiel von Svalbard

Svalbard ist eine zu Norwegen gehörende Inselgruppe im arktischen Ozean. Die geographische Ausdehnung der Inseln liegt zwischen 74° und 81° nördlicher Breite sowie 10° und 34° östlicher Länge. Die größten Inseln sind Spitsbergen, Nordaustlandet und Edgeøya. Die wichtigste Stadt ist Longyearbyen auf Spitsbergen („The Svalbard pages“; <http://www.svalbard.com>; Stand: März 2009). Die Jahresdurchschnittstemperatur liegt bei -6.7 °C („Statistic Norway“; <http://www.ssb.no>; Stand: März 2009).



Abbildung A.2: Inselgruppe von Svalbard. Der rote Stern gibt die Stelle der Probenentnahme für die Erstellung der DsrAB-Datenbank (Station AH) in van Mijenfjorden an. Der blaue Stern markiert die Stelle bei Smeerenburgfjorden, bei welcher das Sediment für den Inkubationsversuch sowie für die Erstellung der 16S-rRNS-Datenbank entnommen wurde (Station J). (Karte aus United States Central Intelligence Agency's World Factbook, 2008)

Mehr als 90 % des Meerbodens weist eine Temperatur von unter 4 °C auf (Levitus 1994). Bakterielle Gemeinschaften, welche in diesen kalten Sedimenten leben, scheinen schlecht an ihre Umwelt angepasst zu sein, da sie bei Temperaturen die weit über ihrer *in situ* - Temperatur liegen, höhere Wachstumsraten oder metabolischen Aktivitäten zeigen (Finke und Jørgensen 2008). Dennoch sind diese Mikroorganismen aufgrund ihrer Physiologie in der Lage sich in diesen extremen Habitaten zu behaupten. Eine der wichtigsten Anpassungen ist dabei ihre Fähigkeit mehr Enzyme mit hoher katalytischen Aktivität bei

niedrigen Temperaturen zu synthetisieren (Feller und Gerday 2003). So weisen psychrophile SRM aus arktischem Sediment eine höher metabolische Aktivität auf als Mesophile bei denselben niedrigen Temperaturen (Knoblauch *et al.* 1999a).

Mikrobiologische Untersuchungen über SRM im arktischen Lebensraum an der Küste von Svalbard beschäftigten sich mit der Aktivität, Abundanz, Diversität und Physiologie psychrophiler Bakterien (Knoblauch und Jørgensen 1999; Knoblauch *et al.* 1999a; Knoblauch *et al.* 1999b; Ravenschlag *et al.* 1999; Sahm *et al.* 1999a; Sahm *et al.* 1999b; Ravenschlag *et al.* 2000; Ravenschlag *et al.* 2001; Finke und Jørgensen 2008; Robador *et al.* 2009).

Des Weiteren konnten im arktischen Sediment vor Svalbard thermophile Mikroorganismen nachgewiesen werden, welche bei den vorherrschenden *in situ*-Temperaturen als Endosporen vorliegen und aus diesem Grund keinerlei Wachstum oder metabolische Aktivität aufweisen (Vandieken *et al.* 2006; Hubert *et al.* 2009). Durch phylogenetische Analysen konnten diese Bakterien der Gattung *Desulfotomaculum*, sowie fermentativen Linien innerhalb dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet werden. Die nächsten beschriebenen Verwandten zweier dieser Phylotypen sind mit Ölreservoirs oder heißen marinen Quellen assoziiert, welche möglicherweise den Ursprung der thermophilen Population in diesem extremen Habitat darstellen (Hubert *et al.* 2009). Ein konstanter jährlicher Eintrag von ungefähr 10^8 m^{-2} Sporen in das arktische Sediment kann dabei für wenigstens die letzten 100 Jahre angenommen werden (Hubert *et al.* 2009). Durch Inkubation des marinen Sediments bei 50 °C konnten die Sporen zur Auskeimung gebracht werden, und die metabolische Aktivität von thermophilen SRM durch Messung der Sulfatreduktionsrate (SRR) nachgewiesen werden (Hubert *et al.* 2009).

Bei ausschließlicher Inkubation des Sediments konnte eine Zunahme der metabolischen Aktivität nach ungefähr 80 Stunden beobachtet werden (Abbildung A.3).

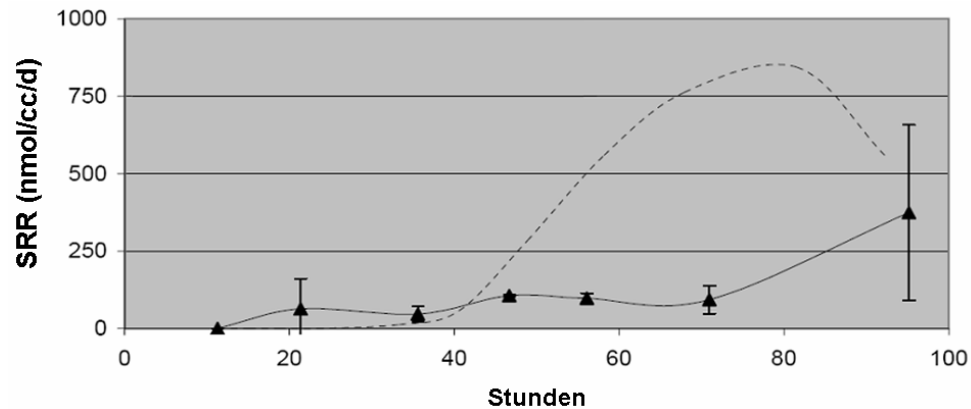


Abbildung A.3: Die Grafik zeigt die mittlere Sulfatreduktionsrate im Zeitverlauf dreier Inkubationen des arktischen Sediments bei 50 °C. Für die Quantifizierung der Mikroorganismen im Rahmen dieser Arbeit wurde jene Inkubation ausgewählt, die nach 20 Stunden Inkubation die höchste Sulfatreduktionsrate aufwies. Die Balken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Die gestrichelte Linie zeigt den Anstieg der Reduktionsrate eines früheren Versuches der Inkubation. (Grafik: Casey Hubert, Marine Mikrobiologie, Max Planck Institut, Bremen)

Durch Zugabe von organischen Substraten (Succinate, Laktate, Formiate, Azetate, Propionate, Butyrate und Ethanol) konnte eine weitere Steigerung der metabolischen Aktivität erreicht, und zwei Anstiege der Sulfatreduktionsrate beobachtet werden: einer nach 20 Stunden und ein zweiter nach ungefähr 80 Stunden Inkubation (Abbildung A.4). Diese Beobachtungen indizieren das Vorliegen von Sporen zweier unterschiedlich schnell wachsender Populationen von SRM im marinen Sediment vor Svalbard.

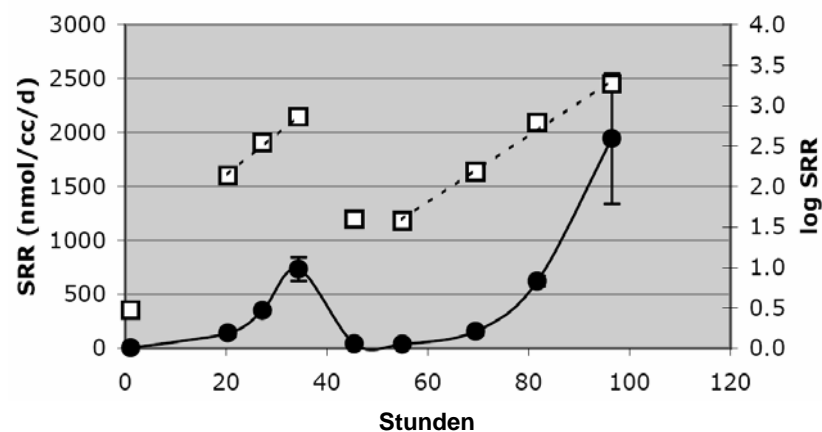


Abbildung A.4: Die Zugabe von jeweils 1 mM an organischen Substraten führte zu zwei beobachtbaren Anstiegen der Sulfatreduktionsrate. Der Inkubation wurde Na_2S beigegeben. (Grafik: Casey Hubert, Marine Mikrobiologie, Max Planck Institut, Bremen)

A.6. Ziele dieser Arbeit

Durch Erstellung einer DsrAB-Sequenzdatenbank wurde ein Einblick in die Diversität psychrophiler SRM im arktischen Sediment vor Svalbard gewonnen. Anhand des Vergleichs mit einer bereits bestehenden Datenbank aus Smeerenburgfjorden (Station J) wurde ermittelt, inwieweit sich die Zusammensetzung der funktionellen Gilde der SRM zwischen diesen beiden Standorten unterscheidet.

Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war die Quantifizierung der in diesem Habitat gefundenen thermophilen SRM im zeitlichen Verlauf der Inkubationen, mit, bzw. ohne initialer Zugabe von organischen Substraten bei 50 °C. Dazu wurde eine spezielle Extraktionsmethode entwickelt, mit welcher die DNS der Sporen sowie jene der vegetativen Zellen zeitgleich isoliert werden konnte. Durch phylogenetische Analysen der aus diesem Habitat extrahierten 16S-rRNS-Sequenzen wurde ein Einblick in die Diversität der thermophilen Mikroorganismen in diesem Lebensraum gewonnen. Anhand dieser Sequenzen wurden schließlich spezifische Primer designt, um die thermophilen Mikroorganismen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) im Verlauf der Inkubationsreihen zu quantifizieren.

B. Material und Methoden

B.1. Probennahme

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen aus arktischem Meeressediment in der Nähe von Svalbard, eine zu Norwegen gehörende Inselgruppe im Nordatlantik und arktischen Ozean.

B.1.1 Entnahme der Proben für die DsrAB-Stammbaumanalyse

Die Proben für die Stammbaumanalyse wurden am 1. August 2006 aus dem Sediment von van Mijenfjorden in einer Meerestiefe von 117 m entnommen. Diese Stelle wurde Station AH benannt und liegt auf den Breitengraden 77° 45' 849 N und 15° 03' 888 E. Die Wassertemperatur betrug an der Oberfläche 5.3 °C und am Grund 1.1 °C.

Das Sediment wurde mit einem Durchmesser von 36 mm ausgestochen und der Tiefe nach (0-2 cm, 2-4 cm, 4-6 cm, 6-8 cm, 8-10 cm und 10-15 cm) in Schraubdeckelröhrchen bei -80 °C gelagert.

B.1.2. Entnahme der Proben für die Inkubation des Sediments bei 50 °C

Für die Inkubation des artischen Sediments bei 50 °C, sowie für die weitere Analysen dieser Proben mittels qPCR und 16S-rRNS-Stammbaumanalyse, wurden die Proben am 7. August 2006 bei Smeerenburgfjord mit der genauen Position 79° 42' 800 N, 11° 05' 200 E in einer Tiefe von ungefähr 200 m entnommen. Die Stelle wurde Station J benannt. Die Temperatur des Wassers betrug am Grund 4.7 °C, die des Sediments 2.2 °C.

Das Sediment aus einer Tiefe von 3 bis 9 cm wurde in Kunststoffbeutel gefüllt und bei 4 °C gelagert.

B.2. Allgemeine Materialien und Techniken

Zur Herstellung aller verwendeten Lösungen, wurde über eine Reinstwasseranlage zweifach entsalztes und filtriertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) herangezogen. Chemikalien wurden – falls nicht anders angegeben - in p.a. Qualität bezogen und verwendet. Alle Lösungen und Puffer wurden mit einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven bei einer Temperatur von 121 °C und bei einem Druck von $1,013 \times 10^5$ Pa für 20 min sterilisiert. Antibiotika und

andere hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren zu den betreffenden Lösungen hinzu pipettiert. Zentrifugiert wurde bei Raumtemperatur (RT) in einer Tischzentrifuge.

B.2.2. Öffentlich zugängliche Software

Tabelle B.1: verwendete Software

Programm	Adresse	Referenz
ARB Software-Paket	http://www.ARB-home.de	(Ludwig <i>et al.</i> 2004)
Analytic rarefaction	http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html	Holland 2004
Basic Local Alignment Search Tool	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	(Altschul <i>et al.</i> 1990)
Bellerophon	http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl	(Huber <i>et al.</i> 2004)
Chromas Pro 1.34	http://www.technelysium.com.au/chromas.html	Technelysium Pty Ltd
DNA/RNA/Protein/Chemical Molecular Weight Calculator	http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html	Chang, Bioscience, Inc.
DOTUR	http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html	(Schloss und Handelsman 2005)
EstimateS (Version 8)	http://purl.oclc.org/estimates	Colwell 2005
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank	Benson <i>et al.</i> 2002
Libshuff	http://libshuff.mib.uga.edu	(Singleton <i>et al.</i> 2001)
Ribosomal Database Project	http://rdp.cme.msu.edu	(Cole <i>et al.</i> 2003)
Ribosomal Database Project, Chimera Check	http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi	
Sigma plot	-	Systat Software Inc., Richmond, CA, USA
SPSS 12.0. (für Windows)	-	
TOBA Release 7.7	http://bergamot.mph.msu.edu/ojs/index.php/toba	(Garrity <i>et al.</i> 2007)
UniFrac	http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp	(Lozupone und Knight 2005; Lozupone <i>et al.</i> 2006)

B.2.3. Technische Geräte

Tabelle B.2: verwendete technische Geräte

Gerät	Hersteller
Bead beater Fast Prep FP 120	Savant Instruments Inc. Holbrook, NY
DNA Sequencer Applied Biosystems 3130	Applied Biosystems Lincoln, USA
<u>Gelschlitten:</u> Sub-Cell GT UV-Transparenter Gel Tray (15x15 cm)	Biorad, München, Deutschland
<u>Gelelektrophorese-Apparatur:</u> Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem MediaSystem FlexiLine 4040	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland

<u>Heizblock:</u> VWR digital Heatblock	VWR International, West Chester, PA, USA
<u>Magnetrührer:</u> RCT basic Variomag [®] Maxi	IKA [®] Werke GmbH, Schwabach, Deutschland Variomag [®] , Dayton Beach, FL, USA
<u>Mikroskop:</u> konfokales Laser-Scanningmikroskop	LSM, 510 m, Zeiss, Jena, Deutschland
<u>PCR- Thermocycler</u> iCycler iCycler iQ Real-Time PCR Detection Mastercycler gradient	Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter, WTW inoLag Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
<u>Pipetten:</u> Pipetman [®] P2-P1000 Eppendorf Research [®] pipettes 1 – 1000 µl	Gilson international, Wien, Österreich Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Photometer:</u> NanoDrop [®] ND-1000 NanoDrop [®] ND-3300	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Reinstwasseranlage	Ultra Clear TM, Barsbüttel, Deutschland
Rundschüttler Innova 2300	New Brunswick Scientific Co., Inc., Madison NJ, USA
Stromquelle für Gelelektrophorese-Apparatur PowerPac Basic	Biorad, München, Deutschland
Transilluminatur UST-30M-8E (312 nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
UV Sterilising PCR Workstation	Peqlab Biotechnology GmbH, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
<u>Wasserbäder:</u> DC19 Thermo GFL Typ 1004	Haake, Karlsruhe, Deutschland Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
<u>Wasserdampf-Hochdruckautoklaven:</u> Varioclav 135S Varioclav 25T	H+P, München, Deutschland H+P, München, Deutschland
<u>Zentrifugen:</u> Mikro 22 R Rotina 35 S	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

B.2.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle B.3: verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG), versch. Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Glaskapillaren (50 µl in 5,1 cm)	Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA
Microseal-Filme: Microseal "A" Film Microseal [®] "B" Film	MJ Research, Waltham, MA, USA Biorad, München, Deutschland

Mikrotiterplatten: Mikroreal™ 96, V-from Thermo-Fast® 96 QPCR plates	MJ Research, Waltham, MA, USA Peqlab Biotechnology GmbH, Deutschland Nunc™ Serving life science, Roskilde, Dänemark
PCR tubes, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Petrischalen 94/16	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, versch. Volumina	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Schraubdeckelröhrchen aus PS (47 mm ø, 30 mm hoch)	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, CM-Membran	Qualilab®, Merk Labor und Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland

B.2.5. Chemikalien

Tabelle B.4: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose: Agarose, Electrophoresis Grad NuSieve® 3:1 Agarose (low-melting-point)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA Bio Science Inc., Rockland, ME, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Borsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Diamidinphenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Lacton, Chemikalien & Laborgeräte, GmBh, Graz, Österreich
DNase I, 100 mg	ROCHE, Diagnostics GmbH, Wien, Österreich
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Formamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fluorescein-Kalibrations-Farbstoff	Biorad, München, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Oxoid LTD., Hampshire, England
Isopropanol (2-propanol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natrium-di-Hydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	J.T. Baker, Deventer, Holland
di-Natriumhydrogensulfat (Na_2HPO_4)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Sauerstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SYBR [®] Green I	Cambrex Bio Science Inc.,
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Oxoid LTD., Hampshire, England
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland

B.2.6. Molekularbiologische Kits zur Extraktion, Aufreinigung und Quantifizierung von DNS

Tabelle B.5: verwendete molekularbiologische Kits

Name des Kits	Hersteller
Power Soil TM DNA Kit	MOBio Lab., Inc., Salana Beach, CA, USA
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
QIAquick PCR purification kit	QIAgen, Hilden, Deutschland
Quant-iT TM PicoGreen [®] dsDNA Assay kit	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
TOPO [®] XL PCR Cloning Kit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
UltraClean TM Soil DNA Isolation Kit	MOBio Lab., Inc., Salana Beach, CA, USA

B.2.7. Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen

a) TE Puffer

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Mit HCl wird ein pH von 8,0 eingestellt.

b) PBS

(i) PBS-Stammlösung (Na_xPO_4)

NaH_2PO_4 (200 mM) 35,6 g/l

Na_2HPO_4 (200 mM) 27,6 g/l

Mit der Na_2HPO_4 -Lösung wurde der pH-Wert der NaH_2PO_4 -Lösung auf 7,2 – 7,4 eingestellt.

(ii) 1 x PBS

NaCl (130 mM) 7,6 g/l

PBS-Stammlösung (10 mM) 50 ml/l

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 1000 ml

pH 7,2 – 7,4

(iii) 3 x PBS

NaCl (390 mM)	22,8 g/l
PBS-Stammlösung (30 mM)	150 ml/l
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,4	

B.2.8. Puffer, Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese

a) TAE - Puffer

(i) 50 x TAE

Tris	2 M
Natriumacetat	500 mM
EDTA	50 mM
Mit Eisessig wurde ein pH von 8,0 eingestellt.	

(ii) 1 x TAE

50 x TAE	20 ml/l
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

b) TAE-Puffer, modifiziert (Millipore)

(i) 50 x TAE, modifiziert

Tris	2 M
EDTA	5 mM

Mit Eisessig wurde ein pH von 8,0 eingestellt.

(ii) 1 x TAE, modifiziert

50 x TAE, modifiziert	20 ml/l
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

c) TBE – Puffer

(i) 10 x TBE

Tris	890 mM	162,0 g/l
Borsäure	890 mM	27,5 g/l
EDTA	20 mM	9,3 g/l
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 ml

pH 8,3 – 8,7 (45°C)

(ii) 1 x TBE

10 x TBE	100 ml/l
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

d) Auftragspuffer

Ficoll	25% (w/v)
Bromphenolblau	0,5% (w/v)
Xylencyanol	0,5% (w/v)
EDTA	50 mM

e) Ethidiumbromid-Lösung

(i) Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in H₂O_{bidest.}

(ii) Ethidiumbromid-Färbelösung

EtBr-Stammlösung 1:10000 in H₂O_{bidest.} verdünnen

f) SYBR Green I-Lösung

(i) SYBR® Green I-Stammlösung

SYBR® Green I 10000 x Konzentrat in DMSO

(ii) SYBR® Green I-Färbelösung

SYBR® Green I-Stammlösung 1:10000 in H₂O_{bidest.} verdünnen

g) DNS-Längenstandard (KbL)

GeneRuler™ 1kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

B.2.9. Nährmedium zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen

a) Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Ein pH-Wert von 7,0 - 7,5 wird eingestellt

Für festes Medium wird vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugegeben.

B.2.10. Antibiotika-Lösungen

Zur Einstellung der benötigten Endkonzentration des Antibiotikums in Festmedien, wurde das Medium nach dem Autoklavieren mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Medium auf eine Temperatur von ungefähr 50 °C abgekühlt war. Diese Medien konnten bei einer Temperatur von 4 °C bis zu vier Wochen gelagert werden. Zu Flüssigmedien wurde unmittelbar vor Gebrauch das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	100 mg/ml
-----------	-----------

Das Antibiotikum wurde in H₂O_{bidest.} gelöst und dem Medium mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugeben.

B.2.11. Lösungen für den Plasmid-Miniprep

a) Puffer P1

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

b) NaOH/SDS-Lösung

H ₂ O _{bidest.}	8 ml
NaOH (2 N)	1 ml
10% SDS	1 ml

c) Kaliumacetat/Acetat-Lösung

KCl (5 M)	6 ml
H ₂ O _{bidest.}	2,85 ml
Eisessig	1,15 ml

B.3. Material und Methoden für die phylogenetisch Analyse von DsrAB- und 16S-rRNS-Sequenzen

Die Isolierung der DNS sowie deren weiteren Analysen wurden ausschließlich für die DsrAB-Datenbank durchgeführt. Die Aufarbeitung und Sequenzierung der 16S-rRNS-Sequenzen erfolgte in der Abteilung Biogeochemie des Max-Planck-Instituts für Marine Mikrobiologie in Bremen. Die Sequenzen wurden anschließend im Rahmen dieser Diplomarbeit Korrektur gelesen, aligned und phylogenetisch ausgewertet (siehe Kapitel B.3.11.1-B.3.11.4).

B.3.1. Methoden der DNS-Isolierung aus Sediment

Für die DNS-Isolierung aus den Sedimenten wurden drei verschiedenen Methoden verwendet, um mögliche methodische Fehler zu minimieren und eine größere mikrobielle Diversität zu erfassen.

B.3.1.1. PowerSoil DNA Isolation kit

Die Anwendung des PowerSoil DNA Kit erlaubt den mechanischen Aufschluss der Zellen mittels einer Perlen-Matrix und einem Vortexer. Im Sediment enthaltene PCR-inhibierende Stoffe, wie Huminsäuren, werden dabei während der Extraktion entfernt. Die Extraktion der genomischen DNS wurde laut Protokoll (Experienced User Protocol) durchgeführt.

Für die Erstellung der DsrAB-Datenbank wurde ungefähr 0,2 g Sediment eingesetzt und die extrahierte DNS in 2x 30 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

B.3.1.2. UltraClean Soil DNA Isolation Kit

Dieses Kit kombiniert den mechanischen Zellaufschluss - der mit einer Perlen-Matrix und einem Vortexer erreicht wird - mit der chemischen Zelllyse mittels SDS. Auch bei dieser Extraktion werden PCR-inhibierende Stoffe während der Extraktion entfernt.

Zur Extraktion wurden von dem Sediment der Station AH ungefähr 0,2 g eingesetzt, und die erhaltene DNS mit 2x 30 µl H₂O_{bidest.} eluiert.

B.3.1.3. DNS-Isolierung nach Griffiths (Griffiths *et al.* 2000)

Lösungen:

CTAB (Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid) Extraktionspuffer

10 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl 500 ml

240 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 500 ml

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

Isopropanol_{absolut}

70 % (v/v) ethanol

Bio-101 Lysematrix A

Die Isolierung der DNS erfolgte nach Anleitung (Griffiths *et al.* 2000) mit der Ausnahme, dass die Fällung der DNS in der wässrigen Phase mittels 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 0,6 Vol. eiskaltem Isopropanol_{absolut} für mindestens zwei Stunden bei RT erfolgte.

B.3.2. Quantitative und qualitative Untersuchung der extrahierten Nukleinsäuren

B.3.2.1. Quantitative photometrische Untersuchung der Nukleinsäuren

Für die quantitative Untersuchung wurden 1,5 µl der extrahierten DNS-Lösung mit dem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Anleitung des Herstellers vermessen.

B.3.2.2. Quantitative Untersuchung der Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren ihrer Größe nach in einer Agarose-Matrix aufgetrennt, da sie aufgrund der negativen Ladung am Phosphat in einem angelegten elektrischen Feld zur positiven Elektrode wandern.

Lösungen

1 % (w/v) Agarose in 1 x TBE Puffer

Auftragspuffer

DNS Längenstandard (KbL)

Ethidiumbromid-Färbelösung (100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung in 1 l H₂O_{bidest.})

Durchführung

Für die Herstellung des Gels wurde 1,2 g Agarose eingewogen, mit 120 ml 1 x TBE Puffer vermischt und in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde das Gel in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Schlitten in die mit 1 x TBE Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt, die DNS 1:1 mit Auftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte – je nach Fragmentlänge - bei einer Spannung von 100 -120 V für 40 bis 90 min. Im Anschluss wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung für ungefähr 45 min gefärbt. Die DNS-Banden wurden durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) mittels eines Transilluminators sichtbar gemacht und durch ein Dokumentationssystem erfasst und digitalisiert.

B.3.3. In vitro-Amplifizierung einzelner Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte Bereiche der DNS mittels spezifischer Primer amplifiziert werden. Dabei werden drei Schritte durchlaufen: die Denaturierung der DNS, Anlagerung der Primer (Annealing) und die Elongationsphase. Während jeder Elongationsphase wird durch die *Taq*-Polymerase templateunabhängig Adenosin-Nukleotide an das 3'-Ende der Amplifikate gehängt, welche für eine spätere Klonierungsreaktion notwendig sind.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Die PCRs erfolgten in einem Thermocycler oder in einem Realtime PCR-Gerät.

Lösungen

MgCl₂ (25mM) (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

10 x Ex *Taq*-Polymerase-Puffer (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

Nukleotid-Mix (2 mM7dNTP) (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

Vorwärtsprimer (50 bzw. 100 pmol/μl)

Rückwärtsprimer (50 bzw. 100 pmol/μl)

Bovin Serum Albumine (BSA; 20 mg/ml)

Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

H₂O_{bidest.}

Standardansatz für eine Reaktion (50 µl):

MgCl ₂	4 µl
Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-mix	5 µl
Vorwärtsprimer	0,5 bzw. 1 µl (Endkonzentration: 250 nM)
Rückwärtsprimer	0,5 bzw. 1 µl (Endkonzentration: 250 nM)
BSA	0,25 µl
Taq-DNS-Polymerase (5u/µl)	0,3 µl
DNS-Lösung	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl

Der Mastermix für die PCR wurde für alle Reaktionen in einem ERG vorbereitet, zu je 49 µl aufgeteilt und anschließend 1 µl DNS-Lösung hinzugegeben. Für die positiv-Kontrolle wurde eine Reaktion mit 1 µl eines Plasmids mit gewünschtem Insert angesetzt, für die negativ-Kontrolle mit 1 µl H₂O_{bidest.}.

Für die Überprüfung der Quantität und Qualität der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe B.3.2.2.).

B.3.3.1. Amplifizierung von 16S-rRNS-Genen

Die bei dieser PCR verwendeten allgemeinen Primer für 16S-rRNS-Genen erfassen die meisten Bakterien.

Die PCR erfolgte mit dem Primer-Paar 616V, 1492 R (Tabelle B.6) mit der in Tabelle B.7 beschriebenen Programmierung des Thermocyclers.

Tabelle B.6: Primer für die 16S-rRNS-Gen Amplifizierung

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C] ^c	Referenz
616V ^a	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	52	(Juretschko <i>et al.</i> 1998)
1492R ^b	GGY TAC CTT ACG ACT T		(Kane <i>et al.</i> 1993), modifiziert

^a V/F, Vorwärtsprimer

^b R, Rückwärtsprimer

^c optimale Annealing-Temperatur des Primers

Tabelle B.7: Programmierung des Thermocyclers für die Amplifizierung von 16S-rRNS-Genen

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	40 sec	30 bzw. 35
Annealing	52	40 sec	
Elongation	72	90 sec	
Finale Elongation	72	10 min	1

B.3.3.2. Amplifizierung von *dsrAB*-Genen

Zur Amplifizierung von *dsrAB*-Genen wurde der Mastermix ohne *Taq*-DNS-Polymerase angesetzt. Erst nach dem initialen Denaturierungsschritt wurden 0,3 µl *Taq*-DNS-Polymerase in jedes ERG hinzupipettiert.

Die im Primer-Mix enthaltenen Primer werden in Tabelle B.8 angeführt, die Programmierung des Thermocycler in Tabelle B.9.

Tabelle B.8: Primer für die Amplifizierung des *dsrAB*-Gens, die Annealing-Temperatur aller Primer lag bei 53 °C

Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz
DSR1F	ACS CAC TGG AAG CAC G	(Wagner <i>et al.</i> 1998)
DSR1Fa	ACC CAY TGG AAA CAC G	(Loy <i>et al.</i> 2004)
DSR1Fb	GGC CAC TGG AAG CAC G	
DSR1Fc	ACC CAT TGG AAA CAT G	(Zverlov <i>et al.</i> 2005a)
DSR1Fd	ACT CAC TGG AAG CAC G	
DSR1Fe	GTT CAC TGG AAA CAC G	Loy (nicht publiziert)
DSR1Ff	AGC CAC TGG AAA CAC G	
DSR1Fg	GGC CAC TGG AAA CAT G	
DSR1Fh	GGC TAT TGG AAG CAC G	
DSR4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA	(Wagner <i>et al.</i> 1998)
DSR4Ra	GTG TAA CAG TTT CCA CA	(Loy <i>et al.</i> 2004)
DSR4Rb	GTG TAA CAG TTA CCG CA	
DSR4Rc	GTG TAG CAG TTT CCG CA	
DSR4Rd	GTG TAG CAG TTA CCA CA	(Zverlov <i>et al.</i> 2005a)
DSR4Re	GTG TAA CAG TTA CCA CA	
DSR4Rf	GTA TAG CAR TTG CCG CA	Loy (nicht publiziert)
DSR4Rg	GTG AAG CAG TTG CCG CA	

Tabelle B.9: Programmierung des Thermocyclers für die Amplifizierung von *dsrAB*-Genen

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	40 sec	35
Annealing	53	40 sec	
Elongation	72	2 min	
Finale Elongation	72	10 min	1

B.3.3.3. M13-Überprüfungs PCR:

Diese PCR erfolgte unter Verwendung des Primer-Paares M13 (Tabelle B.10) und diente der Überprüfung auf mögliche Verunreinigungen der Extraktionen durch Plasmide.

Die PCR wurde dazu in einem Thermocycler, oder in einem Realtime-PCR-Gerät unter Verwendung der in Tabelle B.11 beschriebenen Programmierung durchgeführt.

Tabelle B.10: Primer für die M13- PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C]	Referenz
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G	60	TOPO Cloning Kit
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC		

Tabelle B.11: Programmierung des Thermocyclers für die M13 PCR-Überprüfungs-PCR

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	40 sec	35
Annealing	60	40 sec	
Elongation	72	90 sec	
Finale Elongation	72	10 min	1

B.3.4. Klonierung von Gen-Amplifikaten

Klonierung ist eine effiziente Methode zur Isolierung und Vervielfachung einzelner Sequenzen. Das zu untersuchende Gen wird dabei durch die entsprechenden Primer in einer PCR amplifiziert. Die anschließende Klonierung mittels rekombinanter *E. coli*-Stämme ermöglicht eine Vereinzelung der Sequenzen des PCR-Produkts und durch Anzucht der Bakterien ist eine weitere exponentielle Vervielfachung des Gens möglich

B.3.4.1. Anfügen eines dATP-Überhangs an die PCR-Produkte

Aufgrund von mehrmaligem Einfrieren und Auftauen wird der Überhang der Desoxy-Adenosinnukleotide (dATP) an den 5'-Enden der PCR-Produkte, welcher für den weiteren Klonierungsschritt notwendig ist, fragmentiert. Deswegen wurde vor der Klonierung jede PCR, die eingefroren und wieder aufgetaut wurde, bei 72 °C für 30 min in einem Thermocycler mit den unten angeführten Lösungen inkubiert, was der *Taq*-Polymerase erlaubte die notwendigen dATPs an das PCR-Produkt anzuhängen.

Lösungen

PCR-Produkt	20,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Puffer (10x)	3 µl
dATPs (25 µM)	3 µl
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (5u/µl)	0,5 µl

B.3.4.2. Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Reinigung der PCR-Produkte von möglichen Verunreinigungen, wie unspezifischen DNS-Fragmenten, wurden sie über ein „low-melting-point“ Agarose-Gel aufgetrennt, und

anschließend wurden die Banden der gewünschten Größe ausgestochen. Für die Klonierung der *dsrAB*-Gen-Amplifikate wurden gleiche Mengen an PCR-Produkt der drei verschiedenen Extraktionsmethoden (Kapitel B.3.1.) gepoolt und gemeinsam aufgereinigt.

Lösungen

2 % NuSieve® 3:1 Agarose in 1 x TAE-Puffer

Auftragspuffer

DNS Längenstandard (Kbl)

SYBR® Green I-Färbelösung (SYBR® Green I-Stammlösung 1:10000 in H₂O_{bidest.})

Durchführung

Wie in Kapitel B.3.2.2. beschrieben, wurde zuerst ein 2 % „low-melting-point“-Agarosegel mit einem Gelvolumen von 100 ml vorbereitet. Die 1:1 mit Auftragspuffer vermischten PCR-Produkte wurden in die Taschen des Gels pipettiert und die Auftrennung erfolgte in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Apparatur für 50 min bei 100 mA. Nach dem Anfärben der DNS in der SYBR® Green I-Färbelösung für 40 min wurden die Banden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden wurden 3x mit einer Glaskapillare ausgestochen und in ein ERG überführt. Zusammen mit 50 ml TE-Puffer wurde das Gel auf einem Heizblock für 10 min bei 80 °C geschmolzen und für die Ligation (Kapitel B.3.4.4.) weiterverwendet.

B.3.4.3. Klonierung von Gen-Amplifikaten mittels dem TOPO® XL PCR Cloning Kit

Die Klonierung wurde anschließend mit dem TOPO® XL PCR Cloning Kit für lange PCR-Produkte nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Ligation erfolgt dabei durch die 5'-dATP-Überhänge der PCR-Produkte mit den 3'-Desoxy-Thymidin-Überhänge der TOPO-Plasmide. Diese Insertion wird durch die Topoisomerase katalysiert, welche an den Insertionsstellen des Vektors gebunden vorliegt.

Der 3,5 kb große Vektor kodiert Resistenzgene gegen Kanamycin und Zeocin sowie das letale *ccdB*-Gen. Nur durch die Unterbrechung des *ccdB*-Gens bei der Ligation ist es den transformierten Zellen möglich zu überleben. Zellen die wiederum kein Plasmid aufgenommen haben werden durch ein Kanamycin-hältiges Medium abgetötet.

B.3.4.4. Ligation

Für die Ligation wurde 6 µl PCR-Produkt mit 1 µl Vektor (pCR-XL-TOPO) vermischt und weiter nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

B.3.4.5. Transformation

Die Transformation erfolgte laut Anleitung des Herstellers für chemisch kompetente Zellen. Nach dem letzten Schritt wurden zur Anzucht der Zellen pro Ansatz je 100 µl und 150 µl der transformierten Zellen auf vorgewärmte, Kanamycin-hältige LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

B.3.4.6. Anzucht rekombinanter *E. coli*-Stämme

Lösungen

LB-Medium

Kanamycin-Stammlösung (100mg/ml)

Durchführung

Die Anzucht rekombinanter Zellen erfolgte auf mit 100 µg/ml Kanamycin versetzten LB-Medium über Nacht bei 37 °C.

Für die Anzucht in einem flüssigen Medium wurden die einzelnen Kolonien unter sterilen Bedingungen von der Platte in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium überimpft. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37 °C auf einem Rundschüttler bei 200 rpm. Durch Zentrifugation (14000 rpm, 1 min) in einem 2 ml ERG wurden die Zellen am nächsten Tag geerntet.

B.3.4.7. Identifizierung rekombinanter Klone mittels M13-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Der verwendete TOPO Klonierungs-Vektor besitzt Bindungsstellen für die M13 Primer (Tabelle B.10), welche eine Amplifikation des Inserts ermöglichen. Durch eine anschließende Agarose Gelelektrophorese kann die Größe des Inserts abgeschätzt werden.

Durchführung

Die gewachsenen Kolonien wurden mit einem Zahnstocher unter sterilen Bedingungen auf eine Masterplatte überimpft und bei 37 °C angezogen. Der Mastermix für die anschließende PCR wurde wie in Kapitel B.3.3. beschrieben hergestellt, mit der Ausnahme, dass 25 µl pro Reaktion angesetzt wurden. Die angewachsenen Zellen wurden mit einem Zahnstocher von der Masterplatte abgenommen und in ein Well einer 96-Well Mikrotiterplatte mit vorgelegtem Mastermix abgestreift. Die Platte wurde mit einer hitzestabilen Folie verschlossen und die PCR wurde mit dem in Tabelle B.12 beschriebenen Programm in einem Thermocycler durchgeführt.

Tabelle B.12: Programmierung des Thermocyclers für die M13 PCR

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	7,5 min	1
Denaturierung	95	40 sec	35
Annealing	60	40 sec	
Elongation	72	2 min	
Finale Elongation	72	10 min	1

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1 % Gel, wie in Kapitel B.3.2.2. beschrieben, hergestellt. Mit den Klonen, welche ein Insert gewünschter Größe aufwiesen, wurde für die anschließende Sequenzanalyse eine Plasmid-Isolierung (Kapitel B.3.4.9.) durchgeführt und zur Stammhaltung eine Glycerinkultur (Kapitel B.4.3.8.) angelegt.

B.3.4.8. Stammhaltung

Für eine langfristige Stammhaltung wurden Glycerinkulturen wie folgt angelegt:

Von einer Übernachtskultur wurden unter sterilen Bedingungen 100 µl in ein Well einer 96-well Platte vorgelegt und mit 50 µl einer sterilen 50 % Glycerol-Lösung versetzt. Die Platte wurde mit der entsprechenden Folie verschlossen und bei -80 °C gelagert.

B.3.4.9. Isolierung von Plasmid-DNS aus rekombinanten *E. coli* Zellen

Für die Aufreinigung der Plasmide wurde ein Protokoll verwendet, welche die alkalische Lyse von Zellen, gefolgt von der organischen Präzipitation der Proteinen und Fällung der Plasmid-DNS mittels Isopropanol beinhaltet

Lösungen

P1 Puffer

NaOH/SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1 % SDS)

Kaliumacetat/ Acetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, ca. 10 % (v/v) Acetat)

Durchführung

Die Übernacht-Kulturen wurden in zwei Schritten in einem sterilen 2 ml ERG für jeweils eine Minute bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl von Puffer P1 gelöst und für 5 min bei RT zur Verdauung der RNS inkubiert. Für die Zelllyse wurden 200 µl NaOH/SDS-Lösung hinzugefügt, mehrmals durch Schwenken durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die ERGs ebenfalls mehrmals geschwenkt. Zur Fällung der Proteine wurden 150 µl Kaliumazetat/ Azetat-Lösung hinzugegeben, durchmischt und wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden von der DNS durch Zentrifugation (14000 rpm, 1 min)

getrennt und der Überstand von ungefähr 400 µl in ein neues steriles ERG überführt. Zur Fällung der DNS erfolgte eine Inkubation mit einem Volumen Isopropanol für 10 min bei RT. Anschließend wurde zentrifugiert (14000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und die erhaltenen DNS-Pellets mit 500 µl eiskaltem 70 % EtOH_{abs.} zweimal gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 1 min) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und die Pellets an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurde die DNS in 50 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

B.3.5. Sequenzierung von DNS-Molekülen

Die Sequenzierung wurde mit dem „DNA Sequencer Applied Biosystem 3130“ nach Angaben des Herstellers mit dem Primer TopoSeq-F oder TopoSeq-R (Tabelle B.13) durchgeführt. Da es durch die Länge des *dsrAB*-Gens häufig zum Abbruch der Sequenzierung kam, wurde, um die Sequenz des vollständigen Gens zu erhalten, von jedem OTU (Operational Taxonomic Unit) (Kapitel B.3.11.6.) mehrere Sequenzen ausgewählt und mit den Gen-internen Primern DSR-Seq500F und DSR-Seq1500R (Tabelle B.13) sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend in das Programm ARB (Ludwig *et al.* 2004) geladen, mit dem Programm Chromas Pro Korrektur gelesen und in ARB aligned.

Tabelle B.13: Für die Sequenzierung verwendete Primer (Ivan Barisic, nicht publiziert)

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C]
TopoSeq-F	AGC TTG GTA CCG AGC T	60
TopoSeq-R	TCT AGA TGC ATG CTC GA	60
DSR-Seq500F	CAG GAY GAR CTB CAC CG	50
DSR-Seq1500R	CCC TGN GTR TGN AYR AT	50

B.3.6. Schnellanalyse der Sequenzen

Das Datensuchprogramm „BLAST“ (basic local alignment search tool) (Altschul *et al.* 1990) wurde zur groben taxonomischen Einteilung der Sequenzen verwendet. Dabei werden Datensätze verschiedener Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen durchsucht und ihrer Relevanz entsprechend sortiert.

B.3.7. Vergleichende Sequenzanalyse mit dem ARB Software Paket

Das ARB Software Paket beinhaltet verschiedene Programme und Werkzeuge zur Erstellung und Verwaltung von Sequenz-Datenbanken und deren Analyse. Mit ARB ist

somit Import und Export der Sequenz-Daten, Alignment der Sequenzen, Bearbeitung von Primär- und Sekundärstruktur, Berechnung von Filtern, phylogenetische Analysen auf Sequenz- und Aminosäurenebene sowie Primer- und Sonden Design möglich.

Die Literaturrecherche zur Ermittlung aller beschriebener *dsrAB*-Sequenzen (Stand Dezember 2007) erfolgte über Pubmed (NCBI, National Center for Biotechnology Information). Für die 16S-rRNS Gensequenzen wurde die 90_SILVA Datenbank (www.arb-silva.de) (Pruesse *et al.* 2007) herangezogen.

B.3.9. Automatisches und manuelles Alignment von Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden in ARB importiert und automatisch mit der Funktion „Fast aligner“ des Sequenzeditors aligned. Dabei werden neue Sequenzen mit dem bestehenden Datensatz verglichen und so ausgerichtet, dass homologe Regionen untereinander liegen. War dies nicht möglich, wurden die entsprechenden Bereiche manuell aligned.

B.3.10. Nachweis chimärer Sequenzen

B.3.10.1 Nachweis chimärer *dsrAB*-Sequenzen

Um auszuschließen, dass neu entdeckte Sequenzen des *dsrAB*-Gens auf Chimären zurückzuführen sind, wurden die Sequenzen mittels zwei verschiedenen Methoden überprüft.

Test auf chimäre Sequenzen mittels Bellerophon

Dieser Test auf chimäre Sequenzen wurde mittels dem im Internet zugänglichen Programm Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au>) (Huber *et al.* 2004) durchgeführt. Um herauszufinden, ob eine Sequenz aus zwei Segmenten besteht, wird dabei ein hypothetischer Bruchpunkt mit zwei an beiden Enden anschließenden Fenstergrößen durch die Sequenz bewegt.

Bei dieser Analyse wurde die Huber-Hugenholtz-Korrektur und eine Fenstergröße von 200 Basenpaaren (bp) verwendet.

Test auf chimäre Sequenzen in ARB

Mit allen Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum jeweils für das *dsrA*- als auch für das *dsrB*-Gen mittels Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) berechnet. Wiesen die Sequenzen dabei eine unterschiedliche Topologie auf, wurden sie als mögliche Chimären angesehen und keiner weiteren Analyse zugeführt.

B.3.10.2 Nachweis chimärer 16S-rRNS-Sequenzen

Um auszuschließen, dass es sich bei den neu entdeckten 16S-rRNS-Sequenzen um Chimären handelt, wurden die Sequenzen mittels Bellerophon überprüft.

Der Test auf Chimäre 16S-rRNS-Sequenzen erfolgte mit denselben Einstellungen wie für die Überprüfung der *dsrAB*-Sequenzen verwendet wurden.

B.3.11. Phylogenie

Um die Phylogenie der erhaltenen Sequenzen darzustellen, wurden sie mit dem ARB Software Paket analysiert. Zur Berechnung von auf 16S-rRNS-basierenden Bäumen wurde ein bakterieller Konservierungsfiler von 50% verwendet. Die Bäume wurden mit Sequenzen mit mehr als 1000 bp berechnet. Kürzere Sequenzen wurden anschließend unter Verwendung der kürzesten Sequenz als Filter eingerechnet. Für die Analyse der Aminosäuresequenzen des *dsrAB*-Gens wurde ein indel-Filter verwendet, welcher gewährleistete, dass Regionen mit Insertionen und Deletionen nicht in die Analyse einfließen.

Bei jeder Baumberechnung wurde eine Gruppe nicht verwandter Sequenzen als „Outgroup“ verwendet. Die Wurzel der Bäume wurde schließlich manuell entsprechend dieser „Outgroups“ festgelegt.

Als „Outgroup“ für die Baumberechnung der *dsrAB*-Sequenzen dienten Vertreter der Gattung *Pyrobaculum*, für die Berechnung der 16S-rRNS Bäume hingegen *Archaeoglobus* Arten.

Zur Berechnung der Phylogenie wurden Distanzmatrixmethoden wie Neighbour-Joining und Fitch, sowie merkmalsbasierte Methoden wie Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood verwendet.

B.3.11.1 Neighbour-Joining und Fitch

Neighbour-Joining (Saitou und Nei 1987) und Fitch (Fitch und Margoliash 1967) stellen zwei Verfahren dar, welche phylogenetische Bäume mithilfe von Distanzmatrizen berechnen. Neighbour-Joining (NJ) dient in erster Linie zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen, Fitch von Aminosäuresequenzen. Bei Anwendung dieser Verfahren wird bei jedem Schritt des Algorithmus jene Topologie bevorzugt, welche die geringste Astlänge aufweist. Zwei Sequenzen die einander am ähnlichsten sind, werden in einer Gruppe zusammengefasst und als eine Sequenz angenommen. Die Matrix wird daraufhin neu erstellt, und eine weitere Sequenz dem Baum hinzugefügt. Diese Schritte

wiederholen sich so lange, bis alle Sequenzen in den Baum eingerechnet sind. Am Ende werden Distanz-Werte in erwartete phylogenetische Abstände umgewandelt.

Der große Vorteil dieser Methoden ist die Geschwindigkeit, mit welcher große Datenbanken analysiert werden können. Nachteilig hingegen ist die schrittweise Berechnung des Baumes, wodurch meist nicht die richtige Baumtopologie mit der geringsten totalen Astlänge gefunden werden kann. Der zugrunde liegende Algorithmus berechnet nämlich nicht alle möglichen Bäume um im Anschluss den Optimalen herauszusuchen, sondern verwirft diese schon während der laufenden Berechnung. Es werden somit nicht die Originaldaten, sondern abgeleitete Distanzwerte für die Erstellung der Baumtopologie verwendet.

Durch Berechnung der Distanzmatrix mittels NJ kann die Sequenzähnlichkeit von unterschiedlichen Sequenzen miteinander verglichen werden. Mit dieser Methode wurde die Ähnlichkeit einiger Sequenzen der 16S-rRNS-Datenbank mit jener ihrer nächsten kultivierbaren Verwandten verglichen.

B.3.11.2. Maximum-Likelihood

Basierend auf der Annahme, dass Mutationen unabhängig ihrer Position in der Sequenz auftreten, berechnet Maximum-Likelihood (ML) die Wahrscheinlichkeit jedes evolutionären Schrittes um eine Baumtopologie zu erstellen, welche die Entwicklung der Sequenzen am ehesten beschreibt. Unter all den Bäumen, die mit dem vorhandenen Datensatz konstruierbar sind, wird schließlich jene Baumtopologie ausgewählt, welche die wahrscheinlichste evolutive Entwicklung aller Sequenzen aufzeigt.

B.3.11.3. Maximum-Parsimony

Maximum-Parsimony (MP) basiert auf der Annahme, dass in der Evolutionsgeschichte die Erhaltung eines Merkmals wahrscheinlicher ist als dessen Mutation. Aus diesem Grund wird bei dieser Methode die Baumtopologie erstellt, welche die wenigsten evolutionären Schritte und die kürzesten Astlängen aufweist (Beerli und Felsenstein 1999). Für jede vertikale Spalte der alignierten Sequenzen werden verschiedene Baumtopologien berechnet und die erhaltenen Bäume werden entsprechend ihrer Anzahl an Mutationen, die nötig sind die beobachteten Daten zu erklären, bewertet. Die Topologie, welche dabei die geringste evolutionäre Änderung aufweist, wird schließlich ausgewählt.

Diese Methode ist zuverlässig, solange Mutationen selten auftreten. Sobald beobachtete Merkmale hingegen hochvariabel sind, muss ein anderes Verfahren zur Berechnung der Phylogenie herangezogen werden (Swofford *et al.* 2001).

Die Methode des „Bootstrapping“ lässt sich anwenden, um eine Abschätzung des statistischen Fehlers bei der Berechnung der Baumtopologien zu erhalten. Die Daten werden dabei vielfach zufällig umgestalten und so genannte „Bootstrap-Werte“ werden berechnet. Diese Prozentwerte geben an, wie häufig eine gewisse Verzweigung auftritt.

In dieser Arbeit wurde die Berechnung der „Bootstrap-Werte“ des Maximum-Parsimony Baumes mit 100 Replikaten durchgeführt.

B.3.11.4. TreePuzzle

TreePuzzle ist ein Algorithmus basierend auf der ML-Methode. Alle Sequenzen werden dabei zufällig in Quartette zusammengefasst und alle damit möglichen Baumtopologien erstellt. Die übrigen Sequenzen werden schließlich in den besten Baum eingerechnet. Diese Schritte werden mehrmals mit zufälligen Anordnungen der Sequenzen wiederholt und aus den erhaltenen Topologien wird ein Konsensusbaum erstellt. Für jede Verzweigung werden Wahrscheinlichkeitswerte angegeben.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist der damit verbundene enorme Rechenaufwand.

B.3.11.5. Erstellung eines Konsensusbaumes

Um mögliche Fehlerquellen der einzelnen Baumberechnungsverfahren zu minimieren, wurden die verschiedenen Baumtopologien entsprechend etablierter Richtlinien in einem Konsensusbaum (Ludwig *et al.* 1998) zusammengefasst. Dazu wurden die Topologien der ML-, MP- und NJ- Bäume vereint, indem nur Verzweigungen berücksichtigt wurden, die bei jeder dieser Methoden zu finden waren.

B.3.11.6. Gruppierung der Sequenzen

Für weitere Analysen wurden die erhaltenen Sequenzen zu so genannten OTUs (Operational Taxonomic units) zusammengefasst. Zu diesem Zweck wurde mit dem Werkzeug „Neighbour-Joining“ in ARB eine Ähnlichkeits-Matrix für alle Sequenzen berechnet und in das Programm DOTUR (Schloss und Handelsman 2005) exportiert, welches die verschiedenen OTUs für die *dsrAB*-Nukleinsäuren- sowie für die Aminosäuresequenz für die Vorwärts-, als auch für die Rückwärtssequenzen mit einer

Ähnlichkeit von 90 % definierte. Für die 16S-rRNS Sequenzen wurden die OTUs mit einer Nukleinsäurenähnlichkeit von 99 % definiert.

B.3.11.7. Berechnung der Coverage

Die Coverage (Good 1953) gibt an, in welchem Ausmaß die erhaltenen Gensequenzen die Population der untersuchten Probe repräsentieren.

Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$C_{coverage} = [1 - (n1 \div N)] \cdot 100\%$$

$n1$ = Anzahl der OTUs, welche nur eine Sequenz enthalten

N = Anzahl aller Sequenzen in einer Genbank

Die Berechnung erfolgte für die *dsrAB*-Sequenzen sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Protein-Ebene.

B.3.11.8. Rarefaction-Methode

Eine andere Methode zur Untersuchung, ob die erhaltenen Sequenzen die Diversität in der Probe adäquat repräsentieren ist die Rarefaction-Analyse. Diese Methode (Shinozaki 1963) diente ursprünglich dem Vergleich der Diversität verschiedener Proben, wobei von einer zufälligen Verteilung der Organismen im Raum ausgegangen, und die erwartete Artenanzahl bei einer bestimmten Anzahl von Erfassungseinheiten berechnet wird. Die Berechnung wurde mittels der Analytic Rarefaction Software (Holland, Analytic Rarefaction Software) nach folgender Formel durchgeführt:

$$S(q) = \sum_{i=1}^s \left[1 - \left(\frac{Q - a_i}{q} \right)^q \right]$$

$S(q)$ = zu erwartende Artenzahl für $q = 1, 2, 3, \dots, Q$

q = Erfassungseinheit

Q = Gesamtzahl der Erfassungseinheiten

a_i = Anzahl der Erfassungseinheiten, in denen die Art i enthalten ist (festgestellte Frequenz der Arten)

S = festgestellte Gesamtzahl der Arten

Wird die berechnete Kurve durch eine Gerade mit Anstieg Null beschrieben, ist bei weiterem Sammelaufwand kaum mit neuen Arten zu rechnen (Achtziger *et al.* 1992). Eine Extrapolation auf die erwartete Gesamtzahl von Arten ist bei dieser Berechnung nicht möglich.

B.3.11.9. Chao 1 Estimator

Der Chao 1 Richness Estimator (Chao 1984) ist eine nicht parametrische, statistische Methode zur Erfassung der Diversität. Die Rechnung basiert auf dem MMR-Modell (Mark release recapture Modell), wonach nur jene OTUs herangezogen werden, welche nur durch einen Klon (Singletons) bzw. durch zwei Klone (Doubletons) repräsentiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Wahrscheinlichkeit sinkt eine Art in einer Probe mehr als einmal nachzuweisen, je größer die vorhandene Diversität ist. Je höher also die Anzahl der Singletons im Vergleich zu den Doubletons, desto höher die Diversität. Sobald die Steigung der Kurve einen Wert von Null erreicht, wird davon ausgegangen, dass keine weiteren OTUs gefunden werden können (Achtziger *et al.* 1992).

Folgende Formel wird zur Berechnung herangezogen:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

S_{obs} = Anzahl der beobachteten OTUs

n_1 = Anzahl der Singletons

n_2 = Anzahl der Doubletons

Die Berechnung wurde mit dem Programm EstimateS (Version 8, R. K. Colwell; <http://purl.oclc.org/estimates>), Bias-korrigiert und einer Sequenzähnlichkeit von 90 % für die *dsrAB*-Sequenzen, bzw. 99 % für die 16S-rRNS-Sequenzen durchgeführt.

B.3.12. Vergleich zweier Datenbanken

B.3.12.1 Vergleich zweier Datenbanken mittels Libshuff

Mit dem Libshuff (LIBrary SHUFFling) Programm (Singleton *et al.* 2001) können zwei Genbanken miteinander verglichen werden und dabei Aussagen über die Ähnlichkeit ihrer Zusammensetzung getroffen werden. Dabei arbeitet das Programm mit der Kalkulation von homologen und heterologen Coverage-Kurven. Sind diese beiden Kurven sehr ähnlich, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Zusammensetzung der Genbanken ähnlich ist.

Die homologe Coverage Kurve (C_x) erfasst dabei nur Sequenzen einer Genbank und wird mit folgender Formel berechnet.

$$C_x = [1 - (n_x \div N)]$$

n_x = Anzahl der OTUs, welche nur eine Sequenz enthalten

N = Anzahl aller Sequenzen einer Genbank

Zum Vergleich zweier Genbanken wird die heterologe Coverage Kurve (C_{xy}) herangezogen. Dabei wird jede Gensequenz der Genbank X mit allen Sequenzen der Genbank Y verglichen.

$$C_{xy} = [1 - (n_{xy} \div N)]$$

n_{xy} = Anzahl der OTUs der Genbank X, welche nicht in der Genbank Y gefunden werden

N = Anzahl aller Sequenzen der Genbank X

Die Differenz der beiden Coverage Kurven kann nach der Cramér-von Mises Statistik (Pettitt 1982) mit folgender Formel berechnet werden.

$$\Delta C_{XY} = \sum_{D=0,00}^{0,5} |C_X(D) - C_{XY}(D)|^2$$

D = evolutionäre Distanz

Die evolutionäre Distanz nimmt dabei in Intervallen von 0,01 zu.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz erfolgt ein Monte Carlo resampling. Dabei werden alle Sequenzen der zu untersuchenden zwei Genbanken gemischt und zufällig auf zwei neue Genbanken verteilt, welche dieselbe Größe wie die ursprünglichen Genbanken aufweisen. Anschließend wird ΔC_{xy} der neuen Genbanken berechnet. Dies wird 998-mal wiederholt und die dabei berechneten ΔC_{xy} -Werte werden ihrer Größe nach geordnet. Ist

dabei der ΔC_{xy} -Wert der ursprünglichen Genbanken X und Y größer als 95 % der ΔC_{xy} -Werte aller anderen zufällig Gemischten, so sind die Originalgenbanken bei einem p von 0,05 als signifikant verschieden anzusehen.

B.3.12.2. Vergleich zweier Datenbanken mittels UniFrac-Analyse

UniFrac (Lozupone und Knight 2005; Lozupone *et al.* 2006) ist eine Methode, welche die phylogenetische Distanz zwischen Datensätzen über jene Astlängen bestimmt, welche ausschließlich zu Sequenzen einer einzigen Datenbank führen, niemals jedoch zu mehreren. Um herauszufinden ob zwei mikrobielle Gemeinschaften sich signifikant unterscheiden, werden die Sequenzen randomisiert und anschließend der Anteil jener Astlängen berechnet, welche alleinig zu einer Umwelt führen. Der dabei ermittelte P-Wert gibt den Anteil an randomisierten Bäumen an, welche mindestens so viele einmalige Äste aufweisen, wie der ursprüngliche Baum. Sofern dieser Wert unter einem bestimmten Schwellenwert liegt, werden die Datensätze als signifikant verschieden angesehen.

Zur Berechnung des P-Wertes wurde ein Baum mit allen *dsrAB*-Vollsequenzen der Stationen AH und J mittels ML unter Verwendung eines indel-Filters berechnet und anschließend alle übrigen Kurzsequenzen der Station AH eingerechnet. *Archaeoglobus fulgidus* wurde dabei als „out-group“ verwendet. Der P-Wert für Signifikanz wurde für mehrfache Vergleiche mittels Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Mit Hilfe dieser Korrektur wird die durch die Mehrfachtestung erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art ausgeglichen (Abdi 2007).

Für die 16S-rRNS-Sequenzen wurde ein Baum mittels Maximum Likelihood unter Verwendung eines 50 % Konservierungsfilters berechnet, als „out-group“ diente *Thermophilum pendens* (X14835).

Weiters kann mit der UniFrac-Analyse der G-Test für Signifikanz bei einer festgelegten Entfernung von der Wurzel auf alle nachfolgenden Verzweigungen angewendet werden. Damit kann bei einer festgelegten Astlänge die einzelnen P-Werte der nachfolgenden Verzweigungen berechnet und somit gezeigt werden, ob sich die Genbanken bei dieser phylogenetischen Distanz signifikant unterscheiden.

Für diese Analyse der *dsrAB*-Sequenzen wurde derselbe Baum wie zur Berechnung des P-Wertes mittels UniFrac-Analyse verwendet. Der Baum wurde mit der Option „Justify branchlengths“ exportiert und die Analyse erfolgte bei den Astlängen der einzelnen OTUs entsprechend.

Für die liniensezifische Analyse der 16S-rRNS-Sequenzen wurde für jede Linie ein Baum mittels ML unter Verwendung eines 50 % Konservierungsfilters berechnet. Als „out-group“ diente dabei immer *Thermofilum pendens* (X14835). Der P-Wert für Signifikanz wurde anschließend für jeden Baum einzeln berechnet.

B.4. Material und Methoden zur Quantifizierung thermophiler sulfatreduzierender Prokaryoten

Durch Inkubation des arktischen Sediments der Station J bei einer Temperatur von 50 °C konnte eine Erhöhung der Sulfatreduktionsrate durch thermophile Mikroorganismen nachgewiesen werden (Abbildung A.3 und A.4), welche im Rahmen dieser Diplomarbeit quantifiziert wurden.

B.4.1. Inkubation des Sediments von Smeerenburgfjorden

Die Inkubation des Sediments von Smeerenburgfjorden (Station J) wurde von Casey Hubert in der Abteilung für Biogeochemie des Max-Planck-Instituts für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben der Inkubationsreihen JV-2 (Abbildung A.3) und S4 (Abbildung A.4) untersucht.

Die Proben wurden für bis zu 100 Stunden einer Temperatur von 50 °C ausgesetzt. Die Messung der Sulfatreduktion und die Probenentnahme erfolgten in regelmäßigen Abständen. Die Inkubation JV-2 wurde ausschließlich mit arktischem Sediment durchgeführt, während die Inkubation S4 mit jeweils 1 mM an Succinat, Laktat, Formiat, Azetat, Propionat, Butyrat und Ethanol erfolgte.

B.4.2. Entwicklung und Austestung einer Methode zur Isolierung von DNS aus Sporen und vegetativen Zellen

Um die gesamte DNS der inkubierten Proben isolieren zu können, wurde eine Extraktionsmethode entwickelt mit der genomische DNS von Sporen und vegetativen Zellen zeitgleich isoliert werden konnte. Als Referenzorganismen diente dabei die sporulierte Form von *Desulfotomaculum arcticum*, sowie vegetative Zellen der Organismen *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*.

B.4.2.1. Verdau der DNS von vegetativer Zellen einer Kultur von *Desulfotomaculum arcticum* durch DNase I

Die DNS der in der Kultur von *D. arcticum* befindlichen vegetativen Zellen wurde vor Entwicklung der Extraktionsmethode mittels DNase-Verdaus entfernt, um sicher zu stellen, dass durch die Anwendung der nachfolgenden Extraktionsmethode die DNS der Sporen isoliert werden kann.

Vor Beginn des Verdaus wurden die vegetativen Zellen durch Inkubation der Probe bei 95 °C für 10 min zur Lyse gebracht. Anschließend wurde die gelöste DNS der vegetativen Zellen durch das Enzym DNase wie folgt verdaut.

Lösungen

DNase I- Lösung (2 mg DNase I in 1 ml H₂O_{bidest.})

10-fach Puffer (500 mM Tris-HCl mit einem pH von 8, 100 mM MnCl₂; 1:70 in H₂O_{bidest.})

Durchführung

1700 µl der Kultur wurden mit 200 µl 10-fach Puffer und 100 µl DNase I-Lösung für 90 min bei einer Temperatur von 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die DNase wurde durch anschließendes Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Davon wurden 10 µl zur Kontrolle auf einem Objektträger eingetrocknet, während mit dem Rest die DNS-Isolierung durchgeführt wurde.

Um die Effizienz des DNase-Verdaus zu veranschaulichen, wurden ebenfalls 10 µl der unbehandelten Kultur, sowie 10 µl eines DNase-Verdaus ohne vorangegangener Inkubation bei 95 °C auf einem Objektträger eingetrocknet.

B.4.2.2. Untersuchung der Effizienz des Verdaus der DNS von vegetativen Zellen durch DNase I

Von folgenden Ansätzen wurden jeweils 10 µl auf einem Objektträger eingetrocknet, mit einer DAPI-Lösung gefärbt und anschließend mit einem konfokalen Laser-Scanningmikroskop (CLSM) untersucht:

- (i) Inkubation der Kultur für 10 min bei 95 °C mit anschließendem DNase-Verdau
- (ii) Durchführung des DNase-Verdaus ohne vorangegangener Inkubation
- (iii) unbehandelte Kultur von *D. arcticum*

Durchführung

Die Färbung erfolgte unter einem Abzug mit jeweils 10 µl einer DAPI-Lösung (1: 5000) für 3 min im Dunkeln. Anschließend wurde die DAPI-Lösung abgenommen und es folgten zwei Waschschr tte mit jeweils 10 µl H₂O_{bidest.}. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern wurden die Objektträger im Dunkeln getrocknet. Die anschließende Analyse über den Aufschluss der Sporen wurde mit einem CLSM durchgeführt. Für weitere Untersuchungen wurden die Objektträger in Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

B.4.2.3. Protokoll zur Isolierung von DNS aus Sporen und vegetativen Zellen

Die Isolierung der DNS erfolgte mit dem Power Soil DNS Isolation Kit laut einem veränderten Protokoll sowie zum Vergleich der Effizienz nach Anleitung des Herstellers. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll anstatt für 10 min auf einem Vortexer mittels eines Beatbeaters (3x 30 sek., Geschwindigkeit 5,5). Zwischen den drei Aufschluss-Schritten wurden die ERGs auf Eis gekühlt um eine Überhitzung zu vermeiden und jeweils 10 µl zur späteren Kontrolle auf einem Objektträger aufgetragen. Die DNS wurde für alle Extraktionen am Ende zweimal mit jeweils 30 µl H₂O_{bidest.} eluiert. Die beiden Protokolle wurden ebenfalls für die Isolierung der genomischen DNS der Mikroorganismen *M. luteus*, *B. subtilis* und *E. coli* verwendet.

B.4.2.4. Qualitative Untersuchung des mechanischen Aufschlusses der Sporen

Um den mechanischen Aufschluss der Zellen nachzuweisen wurden 10 µl der unbehandelten Zellkultur, sowie jeweils 10 µl nach jedem Beatbeating-Schritt auf einen Objektträger eingetrocknet, mit einer DAPI-Lösung gefärbt und anschließend mit einem CLSM untersucht (siehe Kapitel B.4.2.2.).

B.4.2.5. Quantitative und qualitative Untersuchung der isolierten Nukleinsäuren

(a) Quantitative photometrische Untersuchung für Nukleinsäuren

Die quantitative Untersuchung der DNS-Lösungen erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer wie in Kapitel B.3.2.1. beschrieben.

(b) Quantitative Untersuchung der Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel B.3.2.2. beschrieben durchgeführt. Anhand des Bandenmusters der isolierten DNS von *M. luteus*, *B. subtilis* und *E. coli* wurde ein erster Rückschluss auf den Zustand der DNS der vegetativen Zellen nach der Zelllyse mittels Beatbeaters gezogen.

(c) Amplifizierung einzelner Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion

Um die Unversehrtheit der isolierten DNS nachzuweisen, wurde überprüft, ob eine Amplifikation mit den allgemeinen 16S-rRNS-Primern 616V und 1492R durchführbar ist. Um eine Kontamination durch Plasmide auszuschließen wurde ebenfalls eine M13 Überprüfungs-PCR durchgeführt. Die PCRs erfolgten dabei wie in Kapitel B.3.3.1. und B.3.3.3. beschrieben.

Weiters wurde eine PCR mit dem Primerpaar DEM116F/DEM1164R durchgeführt, welches spezifisch an 16S-rRNS-Gene von *Desulfotomaculum* Clusters I bindet. Die Primer sind in Tabelle B.14, die Programmierung des Thermocyclers in Tabelle B.15 aufgelistet.

Tabelle B.14: Primer für die Amplifizierung von 16S-rRNS-Genen von *Desulfotomaculum* Cluster I

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta[C°]	Referenz
DEM116F	GTA ACG CGT GGA TAA CCT	60	(Stubner 2002)
DEM1164R	CCT TCC TCC GTT TTG TCA		

Tabelle B.15: Programmierung des Thermocyclers für die Amplifizierung der 16S-rRNS-Gene von *Desulfotomaculum* Cluster I

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	40 sec	30
Annealing	60	40 sec	
Elongation	72	90 sec	
Finale Elongation	72	10 min	1

B.4.3. Isolierung genomischer DNS aus inkubiertem Sediment

Die Isolierung genomischer DNS aus inkubiertem, arktischem Sediment wurde mittels PowerSoil DNA Isolation Kit durchgeführt. Dazu wurden 0,2 g jeder Probe beider Inkubationsreihen eingewogen und die Isolierung wurde nach Anleitung des Herstellers (Experienced User Protocol) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der mechanische Aufschluss der Zellen anstatt für 10 min auf einem Vortexer mittels eines Beatbeaters (3x 30 sec, Geschwindigkeit 5) erfolgte. Zwischen den drei Aufschluss-Schritten wurden die ERGs auf Eis gekühlt. Die DNS wurde am Ende zweimal in jeweils 35 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

B.4.4. Allgemeine quantitative und qualitative Untersuchung der extrahierten Nukleinsäuren

Für eine erste quantitative Analyse wurde die Konzentration der Nukleinsäuren mittels NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer gemessen (Kapitel B.3.2.1.). Um die Amplifizierbarkeit der isolierten DNS nachzuweisen wurde eine 16S-rRNS-PCR wie in Kapitel B.3.3.1. beschrieben durchgeführt. Die Überprüfung auf eine mögliche Kontamination durch Plasmide erfolgte mittels einer M13 Überprüfungs-PCR (Kapitel B.3.3.3.).

B.4.5. Quantifizierung extrahierter Nukleinsäuren mittels PicoGreen®

Die Konzentrationen der extrahierten DNS-Lösungen wurden mittels PicoGreen® dsDNA Quantification Kit nach Anleitung des Herstellers vermessen. PicoGreen® ist ein lichtempfindlicher Farbstoff, der an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet und bei einer Wellenlänge von 480 nm fluoresziert. Das Emissions-Maximum liegt bei 520 nm.

Eine Standardkurve wurde erstellt, indem die Stärke des Fluoreszenzsignals des λ -Phage-DNS-Konzentration-Standards gegen die bekannte Konzentration [ng/ μ l] in Excel aufgetragen und an eine ideale Gerade angeglichen wurde. Durch die Fluoreszenzsignale der mit PicoGreen® behandelten DNS-Lösungen, konnte auf die jeweilige Konzentration der Nukleinsäuren rückgeschlossen werden.

Die DNS-Lösungen wurden im Anschluss mit H₂O_{bidest.} auf 1 ng/ μ l verdünnt, in Aliquots zu jeweils 32 μ l aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

B.4.6. Design von Primern und Austestung ihrer Spezifität für die quantitative Real-Time-PCR

Die idealen qPCR-Bedingungen wurden für die Primer DEM116F und DfmI227R ausgetestet. Dazu wurde zuerst jene Temperatur mittels einer Gradienten-PCR ermittelt, bei welcher der Zielorganismus, nicht aber sein Verwandter mit der geringsten Basenfehlpaarung, nachweisbar ist. Als nächstes wurden die optimalen Konzentrationen der Vorwärts- und der Rückwärts-Primer für die qPCR ermittelt. Dazu wurde für das Primerpaar DEM116F/DfmI227R eine qPCR mit jeder möglichen Kombination an folgenden Endkonzentration durchgeführt: 100, 250, 500, 750 und 1000 nM. Jene Konzentrationen, bei welcher das Fluoreszenzsignal der entsprechenden Reaktion am

frühesten das definierte Signal des Hintergrundes überstieg, wurden für weitere Analysen verwendet (Tabelle B.15). Alle zur Evaluierung dieses Primerpaars durchgeführten PCRs erfolgten mit dem Referenzorganismus *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* (Y11573). Als Nicht-Zielorganismus mit den geringsten Basenfehlpaarungen diente *Desulfotomaculum acetoxidans* (Y11566). Mit diesen Primern, spezifisch für das *Desulfotomaculum*-Cluster I, sollten die Organismen des Anstiegs der SRR nach 80 Stunden Inkubation quantifiziert werden. Durch die gleichzeitige Anwendung der entsprechenden Kompetitoren, sollten die Bakterien isoliert als Proben des Anstiegs nach 20 Stunden Inkubation diskriminiert werden (Tabelle B.15).

Tabelle B.15: Primer, für welche die optimalen Bedingungen für die qPCR evaluiert wurden. Die ideale Annealing-Temperatur bei gleichzeitiger Anwendung der Primer mit ihren Kompetitoren lag bei 71 °C.

Primer	Sequenz (5'-3') ¹	Konz. [nM] ²	Referenz
DEM116F	GTA ACG CGT GGA TAA CCT ³	1000	(Stubner 2002)
DEM116F_Comp	GTA ACG CGT GGA TAA TCT		
Dfm1227R	TGG GAC GCG GAY CCA TC ⁴	500	Loy (nicht publiziert, mod.)
Dfm1227R_Comp	TGG GAC GCG GAY TCA TC		

¹ Der Sequenzunterschied des Kompetitors ist fett hervorgehoben

² Ideale Endkonzentration der Primer und Kompetitoren

³ Sequenz des Nicht-Zielorganismus *D. acetoxidans*: 5' - GTA ACG CGT GGA TAA TCT - 3'

⁴ Sequenz des Nicht-Zielorganismus *D. acetoxidans*: 5' - GAT GAA TCC GCG TCC CA - 3'

Die Basenfehlpaarungen zu dem jeweiligen Primer sind grau unterlegt.

Spezifisch für die Gilde der SRM, welche nach 20 Stunden Inkubation isoliert werden konnten, wurden die Primer Dfm58F und Dfm129R designt (Tabelle B.16). Der Entwurf der Primer erfolgte mit den Programmeinheiten „Probe design“ und „Probe match“ des ARB Software Pakets. Das Werkzeug „Probe design“ durchsucht dabei eine Datenbank nach einer spezifischen Sequenz, welche zuvor mittels einer Suchmaske definiert wurde. Durch die Suche nach Organismen, welche dieselbe oder eine ähnliche Sequenz enthalten, erfolgt die Evaluierung des potentiellen Primers mittels des Werkzeuges „Probe match“. Bei dem Entwurf eines Primerpaares ist darauf zu achten, dass Basenfehlpaarungen zu Nicht-Zielorganismen in der Mitte, bzw. am 3'-Ende eines Primers auftreten oder einer der beiden Primer keine Zielsequenz vorfindet, um diese Organismen effizient zu diskriminieren.

Für die Austestung der idealen Annealing-Temperatur dieser Primer wurde eine qPCR mit einem Gradienten von 58.7 bis 65.6 °C (Zwischentemperaturen: 59.7, 61.1, 63.2 und 64.7 °C) durchgeführt und jene Temperatur für nachfolgende Analysen verwendet, bei welcher das Fluoreszenzsignal am frühesten das Signal des Hintergrundes überstieg.

Weiters wurde eine qPCR mit jeder Kombination an folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 500, 750 und 1000 nM. Als Zielorganismus wurde der Klon_149 (Sequenz siehe Anhang), als Nicht-Zielorganismus *D. thermoacetoxidans* (Y11573) verwendet. Klon_149 wurde aus Proben nach 20 Stunden Inkubation isoliert.

Tabelle B.16: Im Rahmen dieser Arbeit designte Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C]	Konz. [nM]
Dfm58F ²	CAA GTC GAA CGA AGG ATC	62	500
Dfm129R ²	GGT CTG ACA GGC AGA TTA		500

Die Spezifität der Primer wurde mittels der Funktion „Probe Match“ der öffentlich zugänglichen Datenbank „Ribosomal Database Project“ ermittelt (Stand: November 2009) und sind im Anhang angeführt.

B.4.7. Herstellung des Standards für die quantitative Real-Time-PCR

Als Standards für die qPCR wurden lineare PCR-Produkte verwendet, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Plasmid-DNS zu verhindern, da diese durch ihre gewundene Sekundär- und Tertiärstruktur die Effizienz der PCR vermindern könnten.

Als Standard für die qPCR der allgemeinen 16S-rRNS diene *Syntrophobacter wolinii*, für die Quantifizierung der SRM im Verlauf der Inkubationen, der Klon 149, bzw. *D. thermoacetoxidans* (Tabelle B.19). Die Amplifikation der DNS des entsprechenden Inserts eines Vektors erfolgte mit den allgemeinen 16S-rRNS-Primern 616V und 630R. Jeweils drei PCR-Produkte wurden gepoolt und mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration [ng/μl] der aufgereinigten DNS-Lösung mittels PicoGreen[®] dsDNA Quantification Kit laut dazugehörigem Protokoll vermessen. Das Molekulargewicht [g/mol] wurde anschließend mit dem DNA Molecular Weight Calculator (Copyright © 2002-2004 Chang Bioscience, Inc.) (<http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>) für doppelsträngige (ds) DNS mittels der genauen amplifizierten Sequenz berechnet.

Die Umrechnung auf die Kopienzahl der DNS-Matrizen [Moleküle μl⁻¹] erfolgte mit folgender Formel:

$$C_s = C_w \cdot N_A \div M$$

C_s = Kopienzahl der DNS-Matrizen [Moleküle μl⁻¹]

C_w = Konzentration der DNS [g μl⁻¹]

N_A = Zahl von Avogadro [$6,022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹]

M = Molmasse des PCR-Produkts [g mol⁻¹]

Die anschließende Herstellung der Standardreihen erfolgte durch die Vermischung der DNS-Lösungen in einem Verhältnis von 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, bis eine Kopienzahl der DNS-Matrizen von 10^1 pro μl erreicht wurde. Die Standardreihen wurden in Aliquots zu je 30 μl aufgeteilt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

B.4.8. Quantitative Real-Time PCR

Die Zunahme der amplifizierten DNS während einer PCR kann mit einer sigmoiden Kurve beschrieben werden. Zu Beginn der PCR - in der logarithmischen Phase - verdoppelt sich die DNS während jedem Zyklus. Unter optimalen Bedingungen liegt die Effizienz hierbei bei 100 %. Zu einem späteren Zeitpunkt in der PCR sinkt die Effizienz, die beschreibende Kurve flacht ab. In der qPCR kann die DNS mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes, der an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet, quantifiziert werden (Stubner 2002). Dies wird mit Zugabe von SYBR[®] Green I erreicht, dessen Anregung bei einer Wellenlänge von 490 nm und die Emission bei 530 nm liegt. Bei Bindung von SYBR[®] Green I an dsDNS erhöht sich die Intensität des Fluoreszenzsignals um das 10.000-fache.

In jedem Zyklus der PCR wurde nach dem Elongations- und Annealingschritt das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Temperatur lag dabei unter dem Schmelzpunkt der PCR-Produkte, um sicher zu stellen, dass die DNS in doppelsträngiger Form vorlag.

Die Konzentration der zu untersuchenden Sequenz wurde anhand von Standards bekannter Konzentration und deren Fluoreszenzsignalen ermittelt. Die Spezifität der Primer wurde mit der Analyse der Schmelzkurven und mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Lösungen

2 x Platinum [®] SYBR Green I qPCR Super Mix-UDG	25 μl
Vorwärts-/Rückwärtsprimer	entsprechend der Endkonzentration
Fluorescein (1:1000)	0,5 μl
DNS-Lösung (1 ng/ μl)	5 μl
BSA	0,25 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 50 μl

Zusammensetzung des Platinum[®] SYBR Green I qPCR Super Mix-UDG

SYBR Green I

60 U/ml DNS Polymerase

40 mM Tris-HCl mit einem pH von 8,4

100 mM KCl

6 mM MgCl₂

jeweils 400 µM von dGTP, dATP, dCTP und dUTP

40 U/ml Uracil-DNS Glykosydase [UDG] und Stabilatoren

Durchführung

Die qPCR wurde, sowohl für die Standards als auch für die Proben, immer in technischen Triplikaten durchgeführt, um mögliche Fehler, die das Ergebnis der qPCR verfälschen könnten, zu minimieren.

Der Mastermix wurde bis auf die Zugabe der DNS-Lösung hergestellt und jeweils 45 µl in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurde die verdünnte DNS durch mehrmaliges auf- und abpipettieren zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer transparenten Folie (Biorad) verschlossen und in den Thermocycler gegeben. Bei jedem dieser Arbeitsschritte wurde darauf geachtet den Farbstoff so wenig wie möglich dem Licht auszusetzen um ein Ausbleichen zu verhindern. Der iCycler IQ Thermocycler wurde wie in Tabelle B.19 beschrieben programmiert. Eine Digitalkamera fotografierte nach jedem Elongations- und Annealingschritt das emittierte Fluoreszenzsignal. Die Tabelle B.17 beinhaltet die für die Amplifizierung verwendeten allgemeinen 16S-rRNS Primer. Tabelle B.18 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer und Standard-Organismen.

Tabelle B.17: Für die qPCR verwendete allgemeine 16S-rRNS Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C]	Konz. [nM]	Referenz
1389Vs	TG TAC ACA CCG CCC GT	52	750	Duller (nicht publiziert) (Kane <i>et al.</i> 1993), modifiziert
1492R	GGY TAC CTT ACG ACT T		1000	

Tabelle B.18: Übersicht der verwendeten Primer und Standard-Organismen zur Quantifizierung der SRM im Verlauf der Inkubation von arktischem Sediment bei 50 °C

	Verwendete Primer	PCR-Produkt (bp) ²	Standard
Allgemeine 16S-rRNS	1389Vs/1492R	~121	<i>S. wolinii</i>
Erster Anstieg der SRR^{1a}	Dfm58F/Dfm129R	~82	Klon_149
Zweiter Anstieg der SRR^{1b}	DEM116F/DfmI227R und Kompetitoren	~110	<i>D. thermoacetoxidans</i>

¹ Es wurden jene SRM erfasst, von welchen angenommen wurde, dass sie für den Anstieg der Sulfateduktionsrate (SRR) nach ungefähr 20 (1a), bzw. nach ungefähr 80 (1b) Stunden Inkubation verantwortlich waren.

² Anzahl der Basen des amplifizierten Sequenzabschnitts

Tabelle B.19: Programmierung des iCycler IQ Thermocycler

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	40 sec	40
Annealing	52/62/71	40 sec	
Elongation	72	30 sec	
Schmelzkurve	55 – 95	-	1

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit der iCycler IQ Optical System Software V 3.0a (Biorad Laboratorien GmbH, München).

B.4.9. Analysen zur Ermittlung der Spezifität der qPCR

Die Spezifität der qPCR wurde durch die Analyse der Schmelzkurven sowie mittels Gelelektrophorese ermittelt. Weiters wurde ein Nachweis zum Ausschluss der Inhibition der qPCR durch die eingesetzte Menge an DNS durchgeführt.

B.4.9.1. Analyse der Schmelzkurve

Nach jedem qPCR-Programm wurde eine Schmelzkurve gestartet. Dabei wurde bei jedem Schritt, beginnend bei 55 °C, die Temperatur um ein halbes Grad erhöht bis ein Maximum von 95 °C erreicht wurde. Zeitgleich erfolgte die Messung des Fluoreszenzsignals. Die Auswertung erfolgte mit der iCycler Data Analysis Software. Die Schmelztemperatur (T_m) des PCR-Produkts ist jene Temperatur, bei welcher der größte Abfall des Signals auftritt.

B.4.9.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 2 % Agarose-Gel wie in Kapitel B.3.2.2. beschrieben hergestellt. Die Auftrennung der DNS erfolgte bei 100 V für eine Stunde.

B.4.9.3. Nachweis zum Ausschluss einer Inhibition der qPCR durch die eingesetzte Menge der DNS

Um nachzuweisen, dass die eingesetzte Menge der DNS-Lösung keine Stoffe enthält, welche die qPCR hemmen könnten, wurde eine Verdünnungs-Reihe der Umwelt-DNS hergestellt und damit eine qPCR durchgeführt. Dazu wurde für die Inkubation JV-2 die Probe zum Zeitpunkt null vor Pasteurisierung, für die Inkubation S4 jene nach Pasteurisierung verwendet. Die Lösungen wurden auf eine DNS-Endkonzentration im PCR-Ansatz von 25 (1:2), 10 (1:5), 5 (1:10), 2.5 (1:20) und 2 (1:25) ng μl^{-1} verdünnt und eine qPCR mit den allgemeinen Primern 1389Vs und 1492R durchgeführt.

B.4.10. Analyse der Daten der qPCR

Die Daten der qPCR wurden mithilfe des iCycler IQ Optical System Software V 3.0a manuell wie folgt ausgewertet:

Da SYBR[®] Green I unspezifisch an jede dsDNS bindet, wurden nur die Intensitäten der Fluoreszenzsignale nach jedem Elongationsschritt ausgewertet. Die dabei vorliegende Temperatur war höher als nach dem Annealing-Schritt, was eine Verfälschung des Fluoreszenzsignals durch Primer-Dimere ausschloss.

Die Analyse wurde mit der Funktion „PCR base line subtracted“ durchgeführt, für welche Werte zwischen zwei und zehn festgelegt wurden. Die Daten wurden entsprechend der qPCR-Kurve, der Schmelzkurve und der einzelnen Wells analysiert. Einzelne Kurven der qPCR wurden vergrößert dargestellt und erlaubten eine genauere Analyse jedes einzelnen Schrittes der PCR.

Weiters wurde jener Zyklus festgelegt, ab welchem das Fluoreszenzsignal der Reaktionen das definierte Signal des Hintergrundes überstieg [Ct]. Durch eine lineare Korrelation zwischen den Ct-Werten einer Reaktion und der eingesetzten DNS-Menge, war es möglich die Daten anhand der Standards auf einer linearen Regression zu interpolieren. Die Gleichung der Geraden ($y = mx + b$) war nötig um die Anzahl der DNS-Moleküle in den verschiedenen Proben zu berechnen. Die PCR-Effizienz ($\text{PCR}_{\text{Effizienz}} = 10^{-1/\text{Anstieg}}$) aller

qPCR-Ansätze wurde durch den Anstieg der Gerade beschrieben. Der Ct-Wert wurde manuell für jeden Standard und jede extrahierte DNS einer qPCR so festgelegt, dass eine maximale PCR-Effizienz erzielt werden konnte.

Jeder Ct-Wert welcher über dem gemittelten Ct-Wert aller eingesetzten Negativkontrollen lag, wurde keiner weiteren Analyse zugeführt.

C. Ergebnisse

C.1. Phylogenie von SRM im arktischen Sediment vor Svalbard basierend auf vergleichender DsrAB-Sequenzanalyse

Mittels vergleichender Stammbaumanalyse der DsrAB-Sequenzen von Mijenfjorden (Station AH) sowie deren Vergleich mit der Genbank von Smeerenburgfjorden (Station J) sollte ein Einblick in die Diversität von SRM in arktischem, marinem Sediment vor Svalbard gewonnen werden.

C.1.1. Isolierung, Amplifizierung sowie Klonierung und Sequenzierung genomischer DNS

Genomische DNS wurde aus Proben verschiedener Sedimenttiefe (0, 2, 4, 6, 8 und 10 cm) mittels drei verschiedener Methoden extrahiert, um mögliche methodische Fehler der einzelnen Extraktionen zu minimieren. Die Kontrolle der Isolierung erfolgte durch Amplifizierung der 16S-rRNS-Gene mit universellen bakteriellen Primern, wobei für jede Probe und Extraktionsmethode ein Fragment von etwa 1500 bp nachgewiesen wurde. Anhand einer M13-Überprüfungs-PCR konnte eine Verunreinigung der Extraktionen durch Plasmide ausgeschlossen werden. Um für die Amplifizierung des *dsrAB*-Gens mittels spezifischer Primer ein PCR-Produkt entsprechender Länge (ungefähr 1900 bp) zu erhalten, wurde die *Taq*-Polymerase dem Ansatz erst nach dem initialem Denaturierungsschritt hinzu gegeben. Die Klonierung des Produktes dieser PCR in kompetente *E. coli*-Zellen erfolgte mit dem TOPO[®] XL PR Cloning Kit. Von insgesamt 141 Klonen enthielten 101 ein Insert entsprechender Größe, welches anschließend sequenziert wurde. Die erhaltenen Sequenzen wurden in der Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1990) einer Schnellanalyse mittels BLAST-Suche zugeführt, wobei 55 Klone (39 % aller untersuchten Klone) eine hohe Ähnlichkeit mit dem *dsrAB*-Gen aufwiesen.

C.1.2. Sequenzanalysen

Zur Bestimmung der Coverage (Good 1953) wurden die Sequenzen zu OTUs zusammengefasst, wobei eine Sequenzähnlichkeit von 90 % festgelegt wurde. Für die Analyse der Nukleinsäuren konnten 17 OTUs gefunden werden, wovon 9 mit nur einem Klon vertreten waren. OTU 3 enthielt mit einer Anzahl von 19 die meisten Sequenzen,

gefolgt von OTU 2 mit sechs Klonen. Die entsprechende Analyse der Aminosäuren ergab 14 OTUs, wovon sechs nur eine Sequenz enthielten, welche ebenfalls auf Nukleinsäurenebene ein eigenes OTU bildeten. Der Vergleich zeigte, dass fünf Gruppen von Sequenzen sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Proteinebene dieselben OTUs ergaben. Eine Übersicht der OTUs und den dazugehörigen Sequenzen ist im Anhang Tabelle H.1 angeführt.

Die anschließende Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad von 85,5 % für Nukleinsäuren und 89,1 % für Aminosäuren. Des Weiteren wurde mit der Rarefaction-Methode und der Chao 1 Estimator-Analyse bestimmt, inwieweit die erhaltenen Sequenzen die tatsächliche Diversität adäquat repräsentierten.

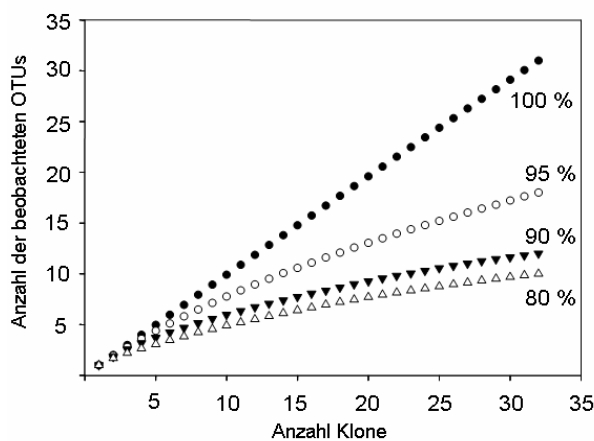


Abbildung C.1: Anzahl der beobachteten OTUs, ermittelt mit der Rarefaction-Analyse für 100, 95, 90 und 80 % Nukleinsäureähnlichkeit.

Die Rarefaction-Analyse (Abbildung C.1) zeigte bei 95 % Sequenzähnlichkeit bereits eine Abnahme der Steigung. Bei einer Annahme von 90 % Ähnlichkeit flachte die Kurve bei Zunahme der Klonanzahl weiter ab. Die Steigung nahm allerdings bei keiner der berechneten Kurven (Ähnlichkeiten: 100, 95, 90 und 80 %) den Wert Null an.

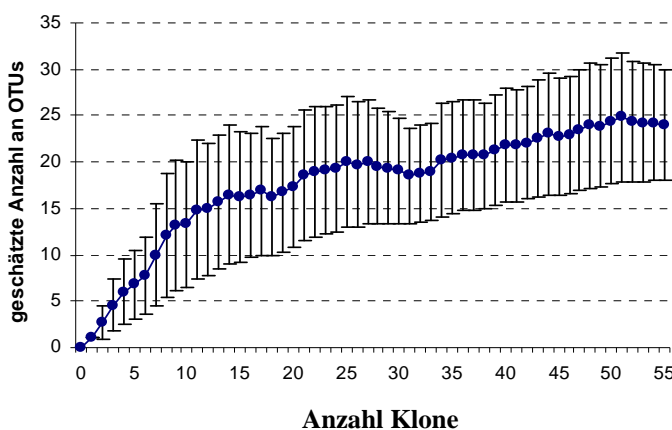


Abbildung C.2: Geschätzte Anzahl an OTUs ermittelt für die Nukleinsäuren mit dem Chao 1 Estimator. Zu jedem Punkt ist die jeweilige Standardabweichung aufgetragen.

Mithilfe der Chao 1 Estimator-Analyse wurde auf die zu erwartende Anzahl an OTUs extrapoliert, welche bei 25 lag (Abbildung C.2).

Die Berechnung der Coverage, sowie die Rarefaction und die Chao 1-Analyse zeigten, dass bei weiterer Beprobung eine weitere Zunahme an OTUs zu erwarten war.

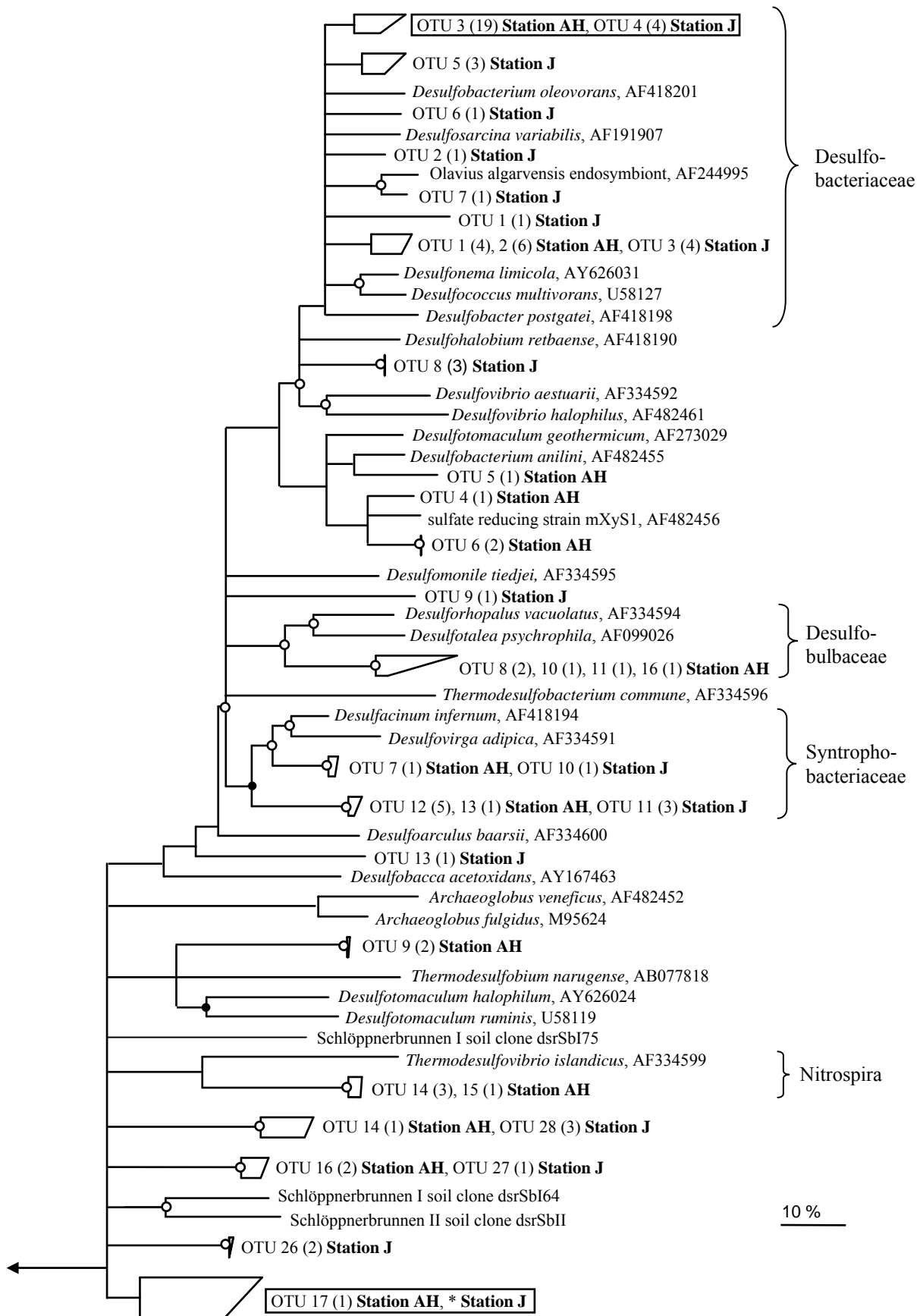
Da es aufgrund der Länge des *dsrAB*-Gens häufig zu einem frühzeitigen Abbruch der Sequenzierung kam, wurde von jedem OTU mehrere Sequenzen ausgewählt und mit dem entsprechenden Rückwärts-Primer, sowie mit den Primern DSR-Seq500F und DSR-Seq1500R, welche innerhalb des Gens binden, sequenziert. Die anschließende Analyse der Vollsequenzen in ARB zeigte, dass eine Sequenz aus OTU 14 und eine aus OTU 16 eine unterschiedliche Phylogenie zu den übrigen Sequenzen des jeweiligen OTUs aufwiesen (Abbildung C.3), und somit ein eigenes OTU bilden mussten.

Durch die anschließende Überprüfung aller Vollsequenzen mittels dreier verschiedener Methoden konnten keine Sequenzen als Chimären identifiziert werden.

C.1.3. Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen wurden mit jenen Klonsequenzen durchgeführt, welche sowohl das Amplifikat des *dsrA*- als auch das *dsrB*-Gens in voller Länge aufwiesen. Aus den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Sequenzen der Station AH sowie der Station J und bereits beschriebenen *dsrAB*-Sequenzen wurden phylogenetische Bäume mit den Berechnungsverfahren Fitch, Maximum-Likelihood (ML) und Maximum-Parsimony (MP) erstellt. Durch Verwendung eines indel-Filters wurden Insertionen, Deletionen und die Enden der Sequenzen ausgeschlossen, sodass ca. 630 Aminosäurepositionen in die Berechnung eingingen. Die Bäume wurden schließlich zu einem Konsensusbaum zusammengefasst (Abbildung C.3).

Abbildung C.3: Phylogenetischer Konsensusbaum der DsrAB-Sequenzen basierend auf den Berechnungsverfahren Fitch, ML und MP. Die dargestellten OTUs umfassen Klone mit mindestens 90 % Nukleotidsequenzähnlichkeit der Stationen AH und J. In Klammern sind die Anzahl aller Sequenzen angegeben, welche dem jeweiligen OTU zugeordnet werden konnten. Der Stern repräsentiert die OTUs 12 (18), 14 (2), 15 (1), 16 (3), 17 (1), 18 (1), 19 (6), 20 (1), 21 (6), 22 (9), 23 (2), 24 (2), 25 (1) der Station J. Bootstrap-Werte wurden mittels 100 Wiederholungen des MP-Berechnungsverfahrens ermittelt. Weiße Punkte entsprechen Bootstrap-Werten > 90 %, Schwarze zwischen 76 und 90. Der Konsensusbaum basiert auf dem Fitch-Distanzmatrix Verfahren. Der Längenbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10 %. Rahmen markieren jene Bereiche im Baum, welche durch das Programm Unifrac als signifikant verschieden ($P \leq 0,001$) identifiziert wurden.



Es wurden 16 monophyletische OTUs der Station J sowie 3 OTUs der Station AH identifiziert, welche keine Verwandtschaft zu kultivierbaren SRM aufwiesen und tiefzweigend waren (Barisic 2007).

Drei OTUs der Station AH (OTU 1 - 3) sowie sieben OTUs der Station J (OTU 1-7) konnten der Familie der *Desulfobacteraceae* zugeordnet werden, vier OTUs (OTU 8, 10, 11 und 16) der Station AH der Familie der *Desulfobulbaceae*. *Desulfobacterium anilini* wies in allen Baumberechnungsverfahren eine hohe Ähnlichkeit mit OTU 5 der Station AH auf und war zusammen mit *Desulfotomaculum geothermicum* der nächste kultivierbare Verwandte von OTU 4 und 6. Zwei OTUs der Station J (OTU 10 und 11) sowie drei der Station AH (OTU 7, 12 und 13) wiesen eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit mit Vertretern der Familie *Syntrophobacteraceae* auf. Des Weiteren gruppierten OTU 8 und OTU 9 der Station J innerhalb der Klasse der *Deltaproteobacteria*, während OTU 13 keiner bekannten Entwicklungslinie zugeordnet werden konnte. OTU 9 der Station AH war Vertretern der Gattungen *Desulfotomaculum* und *Thermodesulfobium* phylogenetisch ähnlich. Für zwei weitere OTUs der Station AH (OTU 14 und 15), konnte ein Vertreter aus der Gattung der *Thermodesulfobivibrio* als nächster Verwandter identifiziert werden.

Somit konnten die meisten OTUs der Station AH (52 % der Sequenzen) der Klasse der *Deltaproteobacteria* zugeordnet werden, während der Großteil der OTUs der Station J (67 % der Sequenzen) tiefzweigend war und keine Verwandtschaft zu kultivierbaren Vertretern aufwies.

Zwei DsrAB-Sequenzen der Station AH (HA2_19full, HA4_16full) enthielten ein Stop-Codon innerhalb des *dsrA*-Gens. Eine weiterer Klon der Station AH (HA3_22full), sowie einer der Station J (J1_18T) wiesen ein Stop-Codon innerhalb der *dsrB*-Sequenz auf.

C.1.3. Vergleich der *dsrAB*-Genbanken der Stationen AH und J

Der Vergleich der *dsrAB*-Genbanken mittels UniFrac-Analyse zeigte, dass die Genbanken signifikant verschieden waren ($P \leq 0.01$). Durch die Linien-spezifische Analyse auf OTU-Ebene wurde durch einen berechneten P-Wert zwischen 0,001 und 0,01 eine Linie innerhalb der Familie der *Desulfobulbaceae* als signifikant verschieden identifiziert (Abbildung C.3), welcher von Sequenzen der Genbank der Station AH dominiert wurde. Innerhalb der monophyletischen Gruppe konnte ein weiterer, von Sequenzen aus der Datenbank der Station J dominierter Bereich identifiziert werden, der mit einem P-Wert zwischen 0,001 und 0,01 als signifikant verschieden angesehen wurde (Abbildung C.3).

Das Programm Libshuff zeigte durch die Analyse der homologen und heterologen Coverage-Kurven der Vollsequenzen mit einer Sicherheit von 95 % ($p = 0,05$), dass die Komposition der Station J mit einem P-Wert von 0,001 signifikant verschieden zu jener der Station AH, aber Station AH nicht signifikant verschieden zur Station J war ($p = 0,934$). Sequenzen der Station AH wiesen demnach eine hohe Ähnlichkeit mit jenen der Station J auf, während in der Genbank der Station J neue Sequenzen vertreten waren. Es soll darauf hingewiesen werden, dass die Analyse mittels Libshuff ausschließlich mit Vollsequenzen erfolgte, während bei der Berechnung der Signifikanz mittels UniFrac ebenfalls die Kurzsequenzen der Station AH berücksichtigt wurden.

C.2. Phylogenie der mikrobiellen Diversität im arktischen Sediment vor Svalbard basierend auf vergleichender Sequenzanalyse der 16S-rRNS Gene

Die 16S-rRNS-basierende Stammbaumanalyse umfasste Sequenzen, welche aus einer Inkubation des arktischen Sediments bei 50 °C mit initialer Substratzugabe isoliert wurden. Es wurden ebenfalls Sequenzen einbezogen, welche aus einer Analyse der inkubierten Sedimentproben mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) mit, bzw. ohne vorangegangener „nested-PCR“ stammten. Des Weiteren wurden Sequenzen analysiert, welche direkt aus dem Sediment von Smeerenburgfjorden (Station J) sowie aus Sediment der Aarhus Bucht in Dänemark isoliert wurden. Für diese Analysen wurden allgemeine 16S-rRNS- sowie *Desulfotomaculum*-spezifische Primer verwendet. Tabelle C.1 gibt eine Übersicht über die analysierten Sequenzen.

C.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Sequenzen

Habitat	Isolierungs- methode	Primer	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs	Coverage ²
20 h Inkubation, Station J	PCR	616V 1492R	73	39	66 %
80 h Inkubation, Station J	PCR	616V 1492R	58	30	64 %
20 h Inkubation, Station J	DGGE-Analyse	C_341 ¹ 907R ¹	62	28	68 %
20 h Inkubation, Station J	nested PCR, DGGE-Analyse	DEM116f DEM1164R C_341 ¹ 907R ¹	27	6	92,6 %
Station J	PCR	DEM116F DEM1164R	42	6	95 %
Aarhus Küste	PCR	<i>Desulfotomaculum</i> - spezifisch	6	1	-

¹ Die Sequenzen der Primer sind im Anhang angeführt

² Coverage siehe auch Kapitel C.2.1.

C.2.1. Sequenzanalysen

Die analysierten 16S-rRNS-Sequenzen wurden zu OTUs zusammengefasst, wobei eine Sequenzähnlichkeit der Nukleinsäuren von 99 % festgelegt wurde.

Durch die Analyse der Sequenzen isoliert nach 20 Stunden Inkubation konnten 39 OTUs gefunden werden, wovon 25 nur einen Klon enthielten. OTU 3 und OTU 17 enthielten mit

einer Anzahl von sieben die meisten Sequenzen, gefolgt von OTU 9 mit fünf Klonen. Die Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad von 66 %.

Für die Sequenzen, welche nach 80 Stunden Inkubation isoliert werden konnten, wurden 30 OTUs gefunden, wovon 21 mit nur einer Sequenz vertreten waren. OTU 3 enthielt mit einer Anzahl von 16 die meisten Sequenzen. Die anschließende Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad der tatsächlichen Diversität von 64 %.

Die DGGE-Sequenzen konnten 28 OTUs zugeordnet werden, wovon 20 OTUs nur eine Sequenz enthielten. Die Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad von 68 %.

Die für diese Genbanken durchgeführte Rarefaction-Methode zeigte, dass die isolierten Sequenzen die jeweilige tatsächliche Diversität nicht adäquat repräsentieren. Mittels der Chao 1 Estimator-Analyse konnte für keine der drei Genbanken auf eine zu erwartende Anzahl an OTUs extrapoliert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Berechnung der Coverage, sowie die Rarefaction und die Chao 1-Analyse zeigten, dass bei weiterer Beprobung eine starke Zunahme an OTUs zu erwarten war.

Die Sequenzen, welche mittels nested-PCR und anschließender DGGE-Analyse isoliert werden konnten, wurden 6 OTUs zugeordnet, wovon zwei mit nur einer Sequenz vertreten waren. Die Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad der mikrobiellen Diversität von 92,6 %.

Sequenzen, welche mittels *Desulfotomaculum*-spezifischen Primern direkt aus dem arktischen Sediment isoliert wurden, konnten 6 OTUs zugeordnet werden, wovon zwei nur jeweils einen Klon enthielten. Die Berechnung der Coverage ergab einen Erfassungsgrad von 95 %.

Für die beiden letzten Genbanken wurde mit der Rarefaction-Methode und der Chao 1 Estimator-Analyse bestimmt, inwieweit die analysierten Sequenzen die tatsächliche Diversität adäquat repräsentieren. Die Rarefaction-Analyse zeigte jeweils bei einer Sequenzähnlichkeit von 99 % eine Abflachung der Kurve. Die Steigung nahm allerdings bei keiner der beiden Genbanken den Wert null an. Mithilfe der Chao 1 Estimator-Analyse wurde auf die zu erwartende Anzahl an OTUs extrapoliert, welche aufgrund derselben Anzahl von Singletons und Doubletons für beide Genbanken bei 11 lag (Daten nicht gezeigt).

Die Sequenzen isoliert aus der Aarhus Bucht in Dänemark wiesen zueinander eine Sequenzähnlichkeit von über 99 % auf und wurden somit einem OTU zugeordnet.

Durch die anschließende Überprüfung der Sequenzen konnten keine Chimären identifiziert werden.

C.2.2. Phylogenetische Analyse der allgemeinen 16S-rRNS-Sequenzen

Die phylogenetische Analyse der allgemeinen 16S-rRNS-Sequenzen umfasste 193 Sequenzen, wovon der Großteil (54 %) der Klasse *Clostridia* zugeordnet werden konnte (Abbildung C.4, Tabelle C.2).

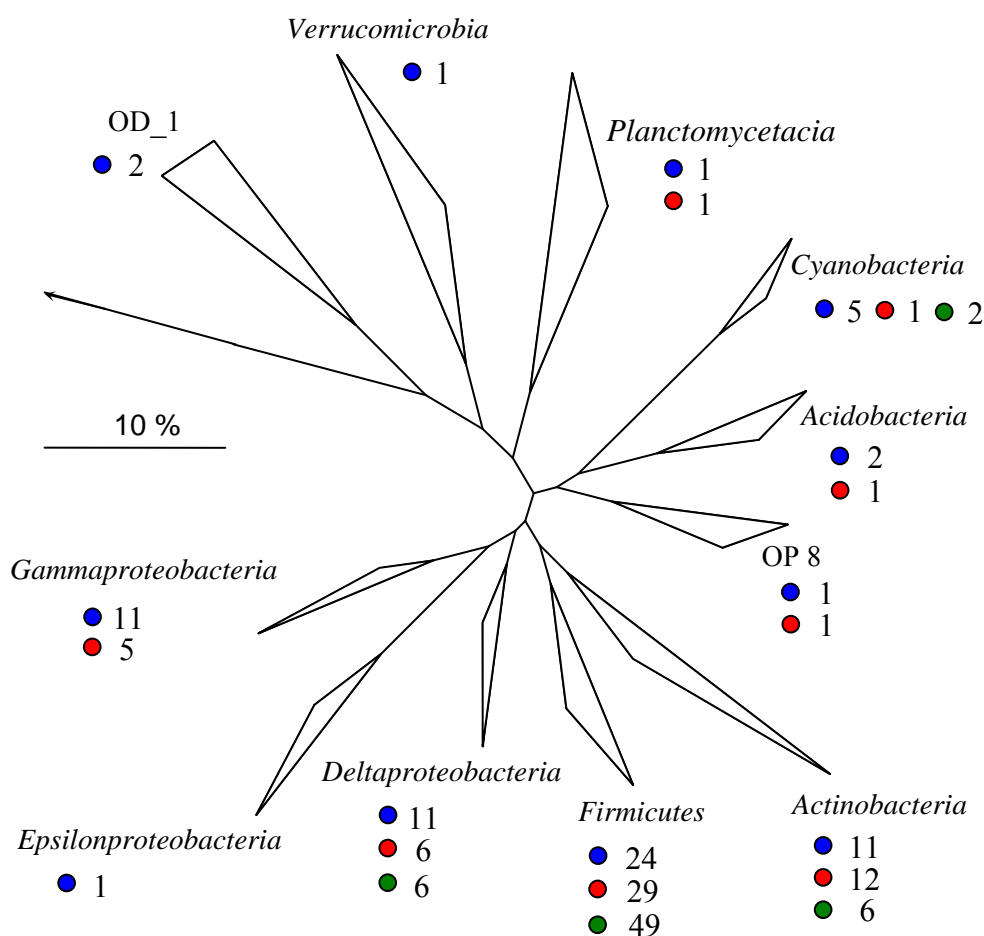


Abbildung C.4: Der Baum zeigt die Verteilung der analysierten allgemeinen 16S-rRNS-Sequenzen der Station J innerhalb der Klassen. Blaue Punkte (●) markieren Sequenzen, welche aus Proben nach 20 Stunden aus der Inkubation S4 isoliert wurden, rote Punkte (●) Sequenzen nach 80 Stunden. Grüne Markierungen (●) repräsentieren Sequenzen, welche aus einer Analyse mittels DGGE stammen. Die Zahl hinter den Punkten gibt die Anzahl der jeweiligen Sequenzen an. Die Sequenzen wurden zuerst in einen allgemeinen 16S-rRNS-Baum eingerechnet und anschließend der abgebildete Baum mit Sequenzen der nächsten kultivierbaren Verwandten sowie der Linien OP 8 und OD_1 mittels ML-Methode berechnet. Der Längsbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10 %.

Tabelle C.2: Übersicht über die phylogenetische Verteilung der OTUs der einzelnen Genbanken. In den Klammern ist die Anzahl der jeweiligen Sequenzen angegeben.

Linie	OTUs		
	20 h Inkubation	80 h Inkubation	DGGE
<i>Acidobacteria</i>	14 (2)	12 (1)	-
<i>Actinobacteria</i>	6 (1), 7 (2), 16 (3), 20 (1), 22 (1), 26 (2), 32 (1)	1 (1), 4 (1), 15 (2), 16 (1), 21 (1), 26 (3), 28 (1), 29 (1), 30 (1)	20 (3), 21 (1), 22 (1), 24 (1)
<i>Cyanobacteria</i>	8 (4), 37 (1)	6 (1)	14 (2)
<i>Deltaproteobacteria</i>	1 (1), 2 (2), 3 (1), 5 (2), 17 (1), 25 (4)	5 (1), 13 (1), 14 (2), 17 (1), 19 (1)	1 (1), 2 (1), 11 (2), 12 (1), 13 (1)
<i>Epsilonproteobacteria</i>	21 (1)	-	
<i>Firmicutes</i>	4 (7), 10 (5), 13 (2), 18 (7), 23 (1), 36 (2)	3 (17), 7 (1), 10 (6), 18 (1), 24 (3), 25 (1)	3 (3), 4 (1), 5 (19), 6 (1), 7 (1), 8 (1), 9 (7), 10 (3), 14 (2), 15 (1), 16 (1), 17 (1), 18 (2), 19 (1), 23 (1), 25 (1), 26 (1), 27 (1), 28 (1)
<i>Gammaproteobacteria</i>	9 (1), 11 (3), 28 (3), 29 (1), 33 (1), 34 (1), 35 (1)	2 (1), 8 (1), 11 (1), 27 (2)	-
OD_1	12 (1), 30 (1)	-	-
OP_8	24 (1)	9 (1)	-
<i>Planctomycetacia</i>	15 (1)	22 (1)	-
<i>Verrucomicrobia</i>	27 (1)	-	-

C.2.2.1. Phylogenie der Sequenzen isoliert nach 20 Stunden Inkubation

Sequenzen, isoliert nach 20 Stunden Inkubation, wiesen eine durchschnittliche Länge von ungefähr 450 bp auf, beginnend bei der *E.coli*-Position 1007 (Brosius *et al.* 1981).

Zwei der gefundenen OTUs konnten den Ordnungen *Pseudomonadales* (OTU 33) und *Thiotrichales* (OTU 34) zugeordnet werden. Für vier weitere konnte kein kultivierbarer Verwandter innerhalb der Klasse der *Gammaproteobacteria* (OTU 9, 11, 28, 29, 35) gefunden werden. Die isolierten Sequenzen wiesen des Weiteren eine phylogenetische Verwandtschaft zu Vertretern der Linien *Desulfobulbaceae* (OTU 5, 3), *Desulfobacteraceae* (OTU 2, 17), *Desulfuromonadales* (OTU 25) und *Bdellovibrionales* (OTU 1) innerhalb der Klasse der *Deltaproteobacteria* auf. Innerhalb der *Epsilonproteobacteria* gruppierte OTU 21 mit Vertretern der Ordnung *Campylobacterales*. Innerhalb der Klasse *Verrucomicrobia* konnte OTU 27 der Ordnung *Verrucomicrobiales* zugeordnet werden. Eine Sequenz (OTU 15) wies eine phylogenetische Ähnlichkeit zu Vertretern der Ordnung *Planctomycetales* innerhalb der Klasse *Planctomycetacia*, zwei weitere (OTU 14) zu Vertretern der Gattung *Acidobacteriales* aus der Klasse der *Acidobacteria* auf. Die Sequenzen zweier OTUs (12, 30) gruppierten mit unkultivierten Bakterien von OD_1

zusammen, eine andere mit OP 8. Fünf Sequenzen (OTU 8 und 37) waren innerhalb der Klasse der *Cyanobacteria* zu finden. Sieben OTUs (6, 7, 16, 20, 22, 26, 32) konnten der Ordnung *Acidimicrobiales* innerhalb der Klasse *Actinobacteria* zugeordnet werden.

Von den Sequenzen, welche im Baum innerhalb der Klasse *Clostridia* zu finden waren (34 % der Sequenzen), wiesen sieben (OTU 4) eine Sequenzähnlichkeit von durchschnittlich 98 % zu *Tepidibacter formicigenes* und fünf (OTU 10) 92 % zu *Caloranaerobacter azorensis* auf.

OTU 18 konnte der Gattung *Desulfotomaculum* zugeordnet werden (Abbildung C.5).

Eine Sequenz (OTU 23) gruppierte innerhalb der Klasse *Mollicutes*.

OTU 38 gruppiert in unterschiedlichen Baumberechnungsverfahren mit verschiedenen Vertretern der *Proteobacteria* und konnte innerhalb der Gruppe nicht weiter zugeordnet werden.

OTU 31 und OTU 39 konnten aufgrund der schlechten Sequenzqualität nicht eingeordnet werden.

C.2.2.2. Phylogenie der Sequenzen isoliert nach 80 Stunden Inkubation

Die meisten Sequenzen, welche aus Proben nach 80 Stunden Inkubation isoliert wurden, wiesen eine Länge von ungefähr 480 bp auf, beginnend bei der *E.coli*-Position 1007.

Vier der gefunden OTUs für den Zeitpunkt nach 80 Stunden Inkubation (OTU 2, 11, 8, 27) konnten der Klasse der *Gammaproteobacteria* zugeordnet werden. Innerhalb der Klasse der *Deltaproteobacteria* konnten fünf Sequenzen (OTU 1, 14, 17, 19) der Ordnung *Desulfobulbacterales* sowie eine weitere (OTU 5) der Ordnung *Desulfuromonadales* zugeordnet werden. OTU 22 gruppierte innerhalb der Ordnung *Planctomycetales*, OTU 6 innerhalb der Klasse der *Cyanobacteria* und OTU 12 innerhalb der Klasse der *Acidobacteria*. Neun OTUs (1, 4, 15, 16, 21, 26, 28, 29, 30) waren im Baum innerhalb der Klasse *Actinobacteria* zu finden. Die Sequenz von OTU 9 wies phylogenetische Ähnlichkeit zu unkultivierten Bakterien von OP 8 auf.

Innerhalb der Klasse *Clostridia* gruppierten 54 % der Sequenzen (OTU 3) isoliert nach 80 Stunden Inkubation. Die ermittelten Sequenzähnlichkeiten waren 97,5 % zu *Tepidibacter formicigenes* (OTU 25), 88 % zu *Garciella nitratreducens* (OTU 7), sowie 91 % zu *Caloranaerobacter azorensis* (OTU 24).

OTU 3 konnte mit 32 % der Sequenzen, welche nach 80 Stunden Inkubation isoliert wurden, der Gattung *Desulfotomaculum* zugeordnet werden (Abbildung C.5).

OTU 20 und OTU 23 konnten aufgrund der schlechten Sequenz nicht eingeordnet werden.

C.2.2.3. Phylogenie der DGGE-Sequenzen

Die meisten Sequenzen der DGGE-Analyse wiesen eine Länge von ungefähr 522 bp auf, beginnend bei der *E.coli*-Position 339.

Von den analysierten Sequenzen gruppieren zwei innerhalb der Klasse der *Cyanobacteria* (OTU 14), sechs innerhalb der *Actinobacteria* (OTU 20, 21, 22, 24). Fünf OTUs (1, 2, 11, 12, 13) konnten der Klasse *Deltaproteobacteria* zugewiesen werden. Die übrigen Sequenzen (78 %) waren innerhalb der Ordnung *Clostridiales* vertreten. 18 % aller DGGE-Sequenzen konnten der Gattung *Desulfotomaculum* zugeordnet werden (Abbildung C.5). Die Berechnung der Sequenzähnlichkeit ergab für 42 % aller DGGE-Sequenzen eine Ähnlichkeit von durchschnittlich 95 % zu *Caloranaerobacter azorensis*.

C.2.3. 16S-rRNS-basierende phylogenetische Analyse der Gattung *Desulfotomaculum*

Innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum* gruppieren 36 Sequenzen (20 %), welche mit allgemeinen 16S-rRNS-Primern amplifiziert wurden.

Sieben davon (OTU 18), welche aus Proben nach 20 Stunden Inkubation stammten, wiesen eine Sequenzähnlichkeit von durchschnittlich 87 % zu *D. halophilum*, einem Vertreter des Clusters If innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum*, auf. Sequenzen der DGGE-Analyse (OTU 8) hatten eine Sequenzähnlichkeit zwischen 90 und 92 % zu demselben Organismus.

Sequenzen, welche nach 80 Stunden Inkubation des arktischen Sediments bei 50 °C isoliert wurden (OTU 3), konnten dem Cluster Ib zugeordnet werden. Sie wiesen dabei eine Sequenzähnlichkeit zwischen 92 und 95 % zu *D. thermosapovorans* auf.

Sequenzen, welche aus einer DGGE-Analyse mit vorangegangener „nested-PCR“ mittels allgemeinen 16S-rRNS und *Desulfotomaculum*-spezifischen Primern stammten, wiesen eine phylogenetische Ähnlichkeit mit Vertretern der Cluster If (OTU 2, 3, 5), Ib (OTU 1, 4) und Id (OTU 6) auf. Die ermittelte Sequenzähnlichkeit für Cluster If lag bei durchschnittlich 92 % zu *D. sp. Lac2*, für Cluster Ib bei 97 % zu *D. thermosapovorans* und für Cluster Id bei 99 % zu *D. thermosubterraneum*.

Jene Sequenzen, welche direkt aus dem Sediment der Station J mittels Primer spezifisch für *Desulfotomaculum* isoliert wurden, fielen in die Cluster If (OTU 3, 4, 6), Ia (OTU 5), und Ib (OTU 1, 2).

Die aus der Aarhus Bucht stammenden Sequenzen wiesen phylogenetische Ähnlichkeit mit Vertretern des Clusters Ib auf.

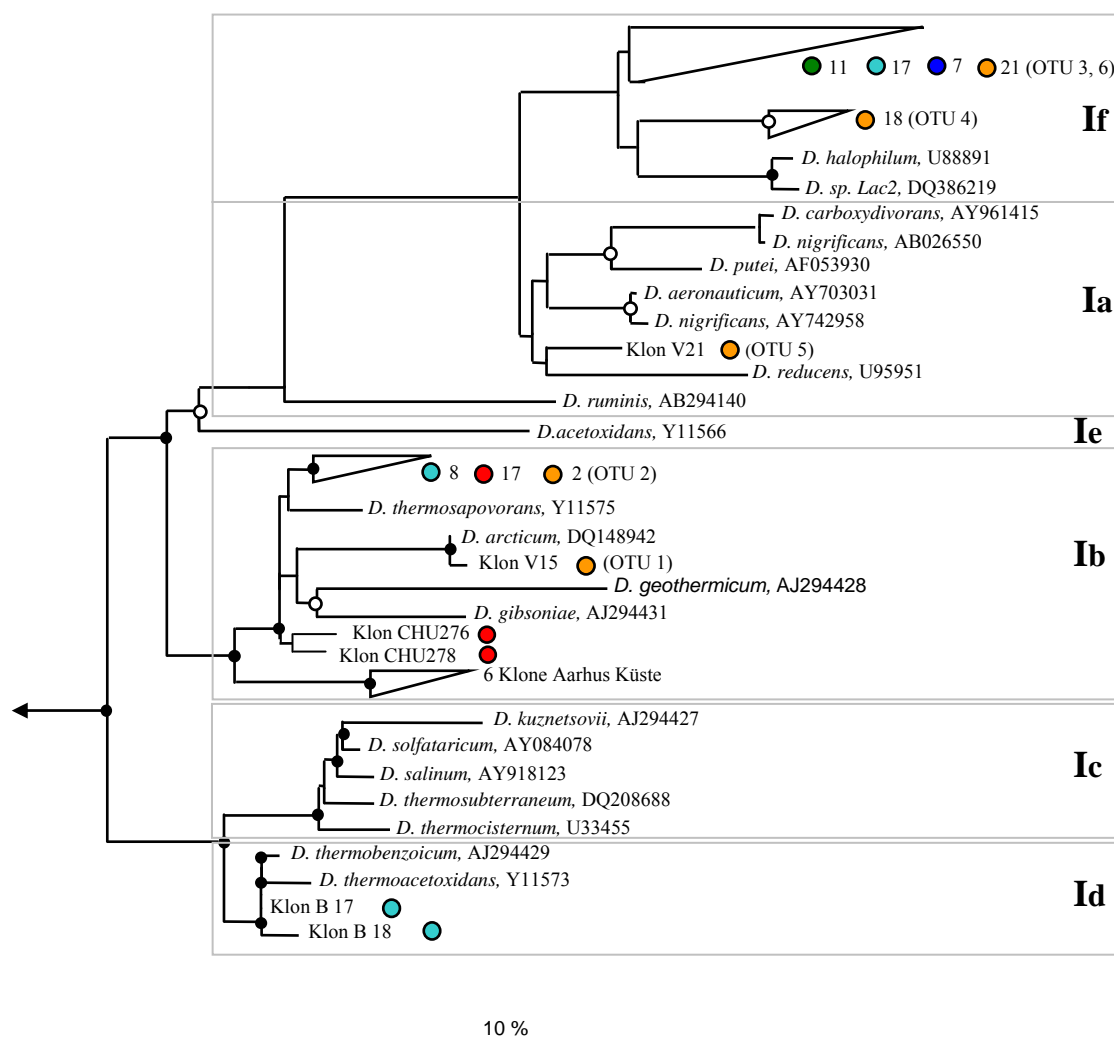


Abbildung C.5: Der Baum zeigt die Verteilung der analysierten Sequenzen innerhalb der verschiedenen Cluster der Gattung *Desulfotomaculum*. Blaue Punkte (●) markieren Sequenzen, welche aus Proben nach 20 Stunden Inkubation isoliert wurden, rote Punkte (●) Sequenzen nach 80 Stunden Inkubation. Grüne Markierungen (●) repräsentieren Sequenzen, welche aus einer Analyse mittels DGGE stammen, türkise (●) Sequenzen, welche mittels nested-PCR und anschließender DGGE-Analyse isoliert wurden. Sequenzen mit einer gelben Markierung (●) wurden direkt aus dem Sediment der Station J unter Verwendung von *Desulfotomaculum*-spezifischen Primern isoliert. Die Zahl hinter den Punkten gibt die Anzahl der jeweiligen Sequenzen an. Der Baum wurde mit Sequenzen über 1000 bp mittels ML-Methode berechnet. Kurzsequenzen wurden im Anschluss unter Verwendung der kürzesten Sequenz als Filter eingerechnet. Der Längsbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10 %.

C.2.4. Vergleich der 16S-rRNS-Genbanken nach 20 und 80 Stunden Inkubation

Der Vergleich der Genbanken nach 20 und nach 80 Stunden Inkubation erfolgte mittels UniFrac-Analyse. Der P-Test ergab, dass die mikrobielle Zusammensetzung der beiden Zeitpunkte mit einem P-Wert von $\leq 0,01$ als signifikant verschieden anzusehen war.

Die Analyse der einzelnen Linien zeigte, dass sich die beiden Genbanken innerhalb der *Firmicutes* signifikant unterschieden (P-Wert zwischen 0,001 und 0,01). Dabei konnte die mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum* als signifikant verschieden identifiziert werden. Die Analyse der übrigen Sequenzen innerhalb der *Firmicutes* zeigte, dass die Genbanken ohne die jeweiligen *Desulfotomaculum*-Sequenzen mit einem P-Wert zwischen 0,01 und 0,05 geringfügig signifikant verschieden waren.

Die UniFrac-Analyse der übrigen Ordnungen zeigte keinen signifikanten Unterschied der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen den beiden Zeitpunkten.

C.3. Quantifizierung thermophiler sporenbildender SRM

Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war die Quantifizierung thermophiler SRM im Verlauf zweier Inkubationsreihen des arktischen Sediments bei 50 °C. Die Inkubation S4 erfolgte nach initialer Substratzugabe, während die Inkubation JV-2 ausschließlich mit marinem Sediment durchgeführt wurde. Durch vorangegangene Pasteurisierung bei 80 °C wurde die psychrophile Population abgetötet.

Für die Extraktion genomischer DNS wurde zuerst eine spezielle Extraktionsmethode entwickelt, mit welcher die DNS der Sporen sowie der vegetativen Zellen isoliert werden konnte. Die Quantifizierung erfolgte im Anschluss mittels qPCR.

C.3.2. Entwicklung und Evaluierung einer Methode zur Isolierung von DNS aus Sporen und vegetativen Zellen

Um die gesamte DNS der inkubierten Proben isolieren zu können, musste eine Extraktions-Methode entwickelt werden, mit der genomische DNS von Sporen und vegetativen Zellen zeitgleich isoliert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden mehrere Extraktions-Protokolle angewendet und teilweise abgeändert, wobei sowohl mit mechanischer, als auch mit chemischer Aufspaltung der Sporen gearbeitet wurde. Als Referenzorganismus diente dabei die sporulierte Form von *Desulfotomaculum arcticum* (Vandieken *et al.* 2006). Die Gram-positiven Mikroorganismen *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* sowie das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* wurden nach derselben Anleitung behandelt, um die Auswirkung der jeweiligen Extraktion auf die DNS vegetativer Zellen auszutesten.

Verfahren zur Eliminierung von DNS vegetativer Zellen

Die DNS der in der Kultur von *D. arcticum* befindlichen vegetativen Zellen wurden vor Entwicklung des Protokolls durch das Enzym DNase zerstört, um zu gewährleisten, dass die anschließend isolierte DNS ausschließlich aus den Sporen stammte. Dazu musste zuerst eine Methode gefunden werden, mit welcher die vegetativen Zellen aus der Kultur entfernt werden konnten, sodass für die spätere Austestung einer geeigneten Extraktionsmethode ausschließlich die sporulierte Form vorlag. Zu diesem Zweck wurde ein Verdau der DNS vegetativer Zellen vorgenommen und dessen Effizienz mittels DAPI-Färbung und konfokalem Laser-Scanningmikroskop (CLSM) kontrolliert. Zum besseren Vergleich wurden drei Ansätze mikroskopisch untersucht: die unbehandelte Kultur selbst, Zellen, an

welchen ausschließlich der DNase-Verdau durchgeführt wurde, sowie ein Ansatz mit vorangegangener Inkubation bei 95 °C.

Die Sporen der unbehandelten Kultur gaben ein starkes Fluoreszenzsignal, und die DNS der vegetativen Zellen war ebenfalls gut in den Zellkernen erkennbar. In der Kultur mit durchgeführtem DNase-Verdau war das Signal der Sporen gleich wie in der unbehandelten Probe. In einzelnen vegetativen Zellen wurde ebenfalls noch DNS nachgewiesen, viele Zellen gaben allerdings kein Signal mehr. Die Kultur, welche vor dem DNase-Verdau bei 95 °C inkubiert wurde, wies insgesamt eine geringere Zelldichte auf. Dies ließ den Schluss zu, dass die meisten vegetativen Zellen bei der hohen Temperatur lysiert sind und die DNS anschließend durch die DNase abgebaut wurde. Das Signal der Sporen in dieser Probe war vergleichbar mit jenem der beiden vorangegangenen Versuche.

Für alle in Folge ausgetesteten Methoden der DNS-Isolierung wurde die Kultur von *D. arcticum* zuvor jeweils für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt, um sicher zu stellen, dass ausschließlich Sporen vorlagen.

Austestung einer Isolierungsmethode von DNS aus vegetativen Zellen und Sporen

Von allen getesteten Methoden der DNS-Isolierung aus Sporen erwies sich die Extraktion mittels Power Soil DNA Isolation Kit nach einer abgeänderten Anleitung am effizientesten. Der mechanische Aufschluss-Schritt erfolgte dabei durch einen Beatbeater und wurde mittels DAPI-Färbung und einem CLSM kontrolliert, wobei eine kontinuierliche Abnahme der Sporenzahl des Referenzorganismus *D. arcticum* beobachtet werden konnte (Abbildung C.6).

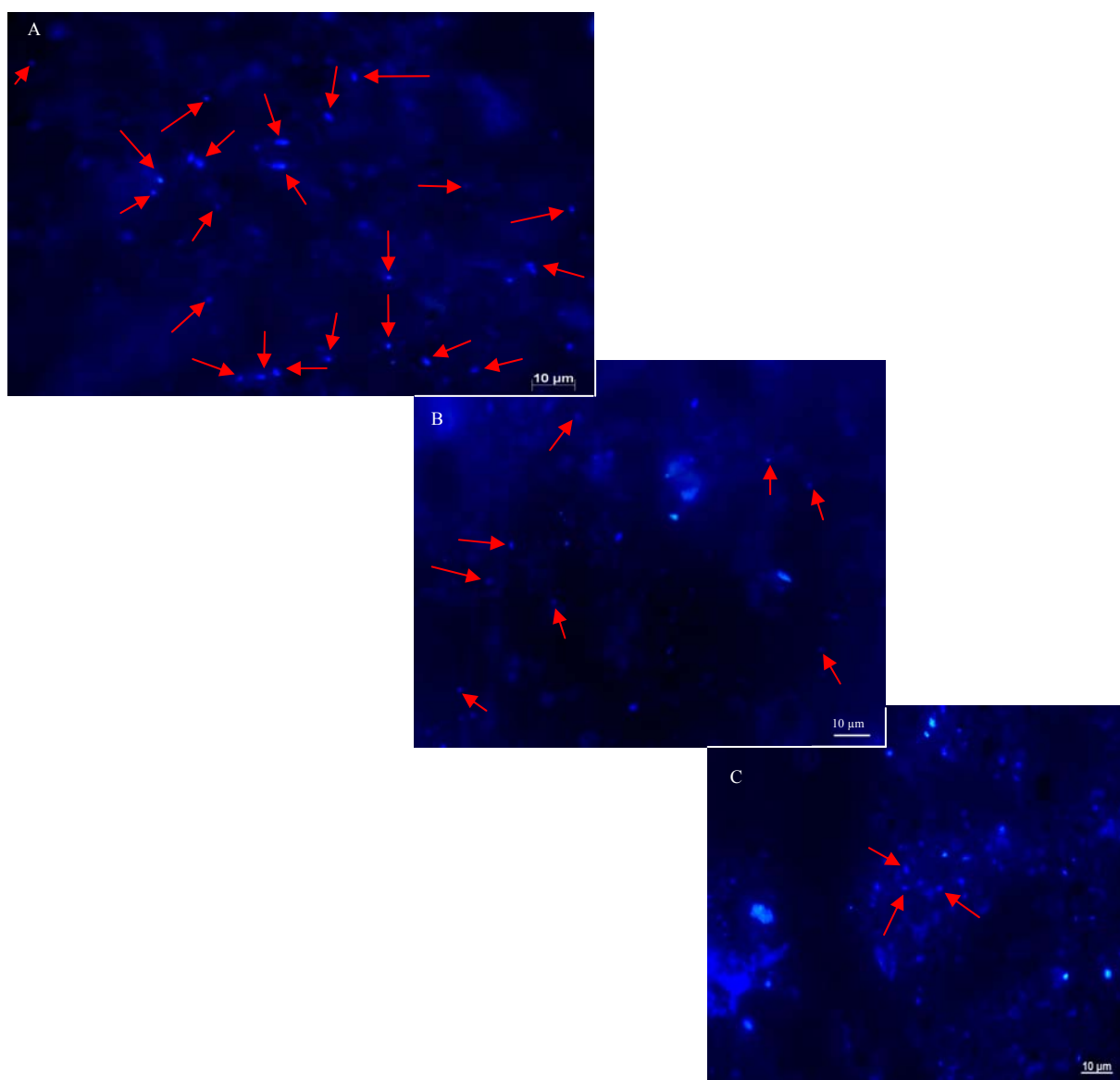


Abbildung C.6: Abnahme detektierbarer Sporen durch den Aufschluss mittels eines Beatbeaters nach (A) 30 sek.; (B) 60 sek.; (C) 90 sek.; Alle Sporen des jeweiligen Ausschnitts wurden manuell mit einem Pfeil markiert um sie von dem stark fluoreszierenden Hintergrund hervorzuheben.

Um einen ersten Rückschluss auf die Unversehrtheit sowie auf die Menge der isolierten DNS der vier Referenzorganismen *D. arcticum*, *E. coli*, *B. subtilis* und *M. luteus* zu erhalten, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Durch Anwendung der DNS-Extraktion nach der abgeänderten, sowie der originalen Anleitung des Herstellers, konnte aus den Referenzorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *M. luteus* hoch molekulare DNS isoliert werden, während die Extraktion der DNS aus Sporen von *D. arcticum* kein Bandenmuster zeigte (Abbildung C.7 (A)). Die DNS der vegetativen Organismen, welche mittels eines Beatbeaters isoliert wurde, wurde durch das Aufschlussverfahren stärker fragmentiert als jene der Kontrolle (Abbildung C.7).

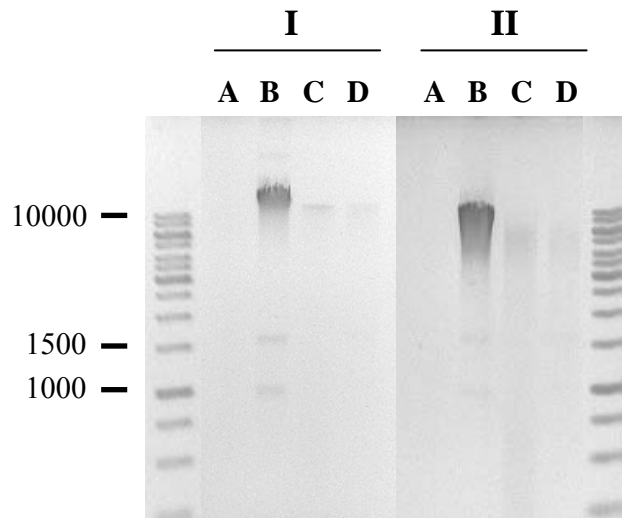


Abbildung C.7: Genomische DNS der vier Referenzorganismen *D. arcticum* (A), *E. coli* (B), *B. subtilis* (C) und *M. luteus* (D) extrahiert mittels Power Soil DNA Isolation Kit nach Anleitung des Herstellers (I) und mittels abgeändertem Aufschlussverfahren durch einen Beatbeater (II). Zu beiden Seiten wurde Kbl (10000 bp – 250 bp) aufgetragen. *D. arcticum* lag bei Extraktion in sporulierter Form vor.

Die Untersuchung der Qualität der isolierten DNS erfolgte des Weiteren durch eine Amplifizierung mittels PCR unter Verwendung allgemeiner 16S-rRNS-Primer. Eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese zeigte für alle Referenzorganismen beider Extraktionsmethoden Banden entsprechender Größe.

Um eine mögliche Kontamination durch Plasmide auszuschließen, wurde eine M13-Überprüfungs-PCR durchgeführt, welche negativ ausfiel.

C.3.3. Isolierung der DNS aus Sediment, anschließende PCR und Bestimmung der DNS-Konzentration

Genomische DNS wurde aus Proben der Inkubationsreihen JV-2 und S4 mittels Power Soil DNA Isolation Kit nach dem evaluiertem abgeändertem Protokoll isoliert. Der mechanische Aufschluss erfolgte dabei mit Hilfe eines Beatbeaters. Im Anschluss wurde eine Amplifizierung der 16S-rRNS-Genen mit den Primerpaaren 616V/1492R (Kane *et al.* 1993; Juretschko *et al.* 1998) und DEM116F/DEM1164R (Stubner 2002) sowie eine M13-Überprüfungs-PCR zum Ausschluss einer möglichen Kontamination durch Plasmide vorgenommen. Mit den allgemeinen 16S-rRNS-Primern konnte aus allen Extraktionen hoch molekulare DNS von ungefähr 1500 bp amplifiziert werden. Mit den Primern DEM116F/DEM1164R war eine DNS-Amplifikation für die Inkubation S4 erstmals nach 20 Stunden, für die Inkubation JV-2 nach 35 Stunden möglich. Das PCR-Produkt wies

dabei eine Länge von 1000 bp auf. Durch die M13-Überprüfungs-PCR konnte eine Kontamination durch Plasmide ausgeschlossen werden. Die Konzentration der DNS wurde mit dem „PicoGreen® dsDNA quantification kit“ bestimmt. Bei der Inkubationsreihe JV-2 war, außer einem leichten Anstieg bei 20 Stunden und einem weiteren bei 40 Stunden Inkubation, eine Abnahme der DNS-Konzentration erkennbar. Zu Beginn der Inkubation S4 sank die DNS-Konzentration ebenfalls stark ab, um nach 30 Stunden erstmals wieder anzusteigen. Zwei weitere Anstiege waren nach 56 und 94 Stunden Inkubation zu beobachten. Der jeweilige Verlauf der DNS-Konzentrationen beider Inkubationsreihen ist in Abbildung C.8 dargestellt, die genauen Zahlen sind im Anhang angeführt.

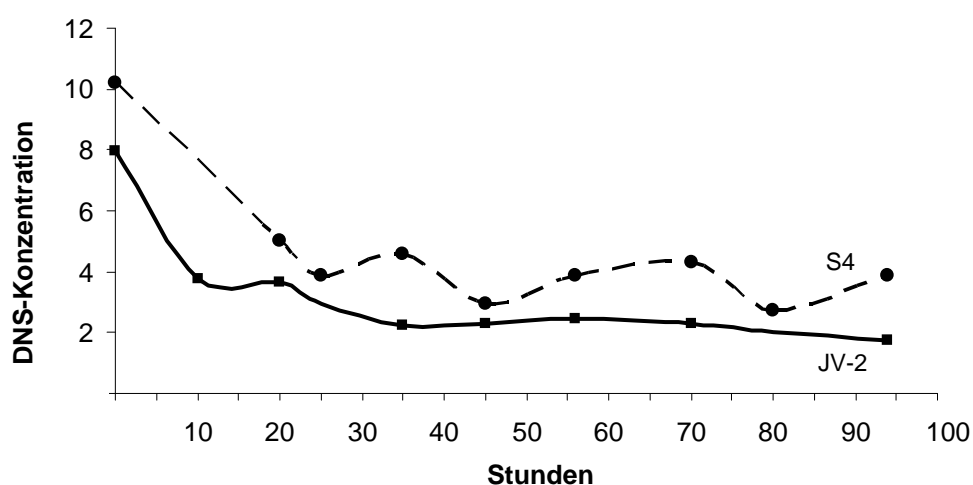


Abbildung C.8: Verlauf der mittels PicoGreen gemessenen DNS-Konzentrationen [ng/μl] im zeitlichen Verlauf der Inkubationsreihen JV2 und S4.

C.3.3 Design von Primern und Austestung ihrer Spezifität für die qPCR

Das Primerpaar Dfm58F/Dfm129R wurde spezifisch für jene Organismen designt, von welchen angenommen wurde, dass sie den ersten Anstieg der Sulfatreduktionsrate nach 20 Stunden Inkubation bewirkten. Alle untersuchten Ziel-Sequenzen wiesen die Primerbindungsstellen ohne Fehlpaarung auf. Der Vorwärtsprimer bindete mit seiner ersten Base an der Position 58 für *E. coli* (Brosius *et al.* 1981), der Rückwärtsprimer an Position 129. Das Amplifikat umfasste dabei insgesamt 82 Basen. Die optimale Annealing-Temperatur, bei welcher der Nicht-Zielorganismus *D. thermoacetoxidans* erfolgreich diskriminiert werden konnte, lag bei 62 °C, die ideale Endkonzentration beider Primer bei 500 nM. Als weiterer Nicht-Zielorganismus konnte *Pelotomaculum isophthalicum* (AB232785) identifiziert werden, dessen 16S-rRNS-Sequenz eine Basenfehlpaarung zum Rückwärts- und drei zum Vorwärtsprimer aufwies.

Für die Quantifizierung jener SRM, deren genomische DNS aus Proben des zweiten Sulfatreduktionsanstiegs nach ungefähr 80 Stunden isoliert werden konnte, wurden die idealen Bedingungen der Primer DEM116F (Stubner 2002) und DfmI227R (Loy, nicht publiziert) ausgetestet. Die optimale Annealing-Temperatur wurde dabei mit 66,5 °C, die ideale Primerendkonzentrationen mit 1000 nM für den Vorwärts- und 500 nM für den Rückwärtsprimer festgelegt. Manche Sequenzen, welche aus Proben nach 20 Stunden Inkubation isoliert wurden, wiesen zu den Primersequenzen nur eine Basenfehlpaarung auf und konnten nicht effizient diskriminiert werden. Aus diesem Grund wurde bei der Quantifizierung der SRM des zweiten Anstiegs der Sulfatreduktionsrate nach 80 Stunden Inkubation zusätzlich zwei Kompetitoren (DEM116F_comp und DfmI227R_comp) verwendet. Bei gleichzeitiger Anwendung der Primer und Kompetitoren lag die optimale Annealing-Temperatur bei 71 °C.

Insgesamt konnten in der ARB-Datenbank 374 Sequenzen identifiziert werden, welche maximal eine Basenfehlpaarung zu den Primern aufwiesen. Davon konnten 74 % dem Phylum Firmicutes zugeordnet werden. Die Primer in Kombination mit ihren Kompetitoren waren allerdings für die Quantifizierung der SRM, isoliert nach 80 Stunden Inkubation spezifisch.

Die genaue Spezifität der einzelnen Primer wurde mit der öffentlich zugänglichen Datenbank „Ribosomal Database Project“ ermittelt und sind im Anhang angeführt.

C.3.4. Ermittlung der Spezifität der qPCR

Um aufzuzeigen, ob die für die Quantifizierung eingesetzte Verdünnung der Umwelt-DNS eine PCR-Effizienz, vergleichbar mit jener der Standards aufwies, wurde für jede Inkubation eine Verdünnungsreihe einer Probe hergestellt und anschließend eine qPCR mit den allgemeinen bakteriellen Primern 1389Vs (Duller, nicht publiziert) und 1492R (Kane *et al.* 1993) durchgeführt. Die Analyse der gewonnenen Daten zeigte eine lineare Korrelation zwischen der PCR-Effizienz und der eingesetzten Startkonzentration der DNS (Abbildung C.9), wodurch eine Hemmung der Amplifikation durch Stoffe in der Umwelt-DNS ausgeschlossen werden konnte. Einzig die Probe, welche nach 94 Stunden der Inkubation JV-2 entnommen wurde, lag mit einer Verdünnung von 1:1,07 außerhalb des untersuchten Bereichs von 1:2 bis 1:25.

Die PCR-Effizienz sowie der Korrelationskoeffizient dieser qPCR sind in Tabelle C.3 aufgelistet.

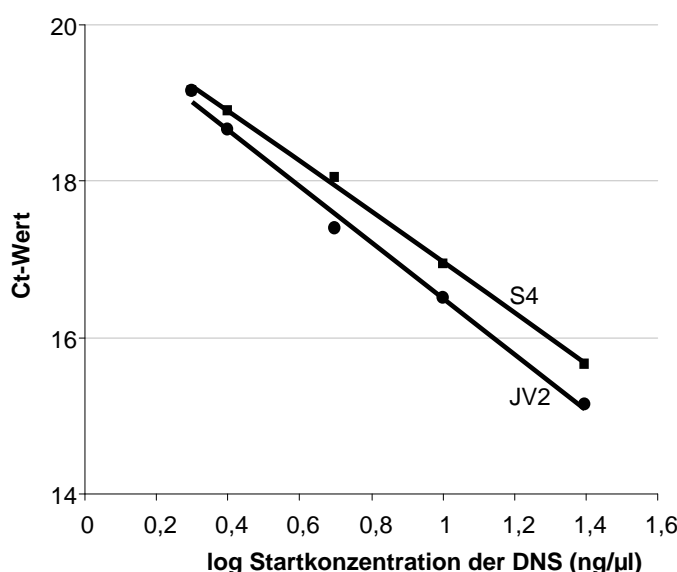


Abbildung C.9: Ergebnis der qPCR für die Verdünnungsreihe der Umwelt-DNS

Als Standard für die Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS im Verlauf der Inkubationsreihen diente *S. wolinii*. Als Standard für die Quantifizierung der SRM des ersten Anstiegs der Sulfatreduktionsrate nach 20 Stunden Inkubation wurde der Klon_149, für jene des zweiten Anstiegs nach 80 Stunden *D. thermoacetoxidans* herangezogen. Anhand der bekannten Konzentrationen der Standards (Tabelle C.3) wurden Standardreihen hergestellt, durch welche die Kopienzahl der DNS-Matrizen in den Proben bestimmt werden konnte. Die PCR-Effizienzen sowie die Korrelationskoeffizienten der durchgeführten qPCRs sind in Tabelle C.4 aufgelistet.

Tabelle C.3: Verwendete Standards, ihr Molekulargewicht sowie die errechnete Kopienzahl der DNS-Matrizen (unverdünnt)

Standards	Molekulargewicht (kDa)	Kopienzahl μl^{-1}
<i>S. wolinii</i>	1063,9	1,69E+09
Klon_149	1078,8	2,64E+08
<i>D. thermoacetoxidans</i>	1115,4	3,30E+09

Tabelle C.4: Effizienzen der Polymerase-Kettenreaktionen sowie die Korrelationskoeffizienten (R^2), Daten der qPCR zur Quantifizierung der SRM des zweiten Anstiegs sind nicht aufgelistet

qPCR für	Inkubation	PCR-Effizienz (%)	R^2
allgemeine 16S-rRNS	S4	94,2	0,993
	JV-2	92,5	0,988
SRM des ersten Anstiegs der SRR	S4	64,6	0,995
	JV-2	64,6	0,996
Verdünnungsreihe der Proben	S4	102,6	0,999
	JV-2	95,9	0,992

Zum Nachweis der Spezifität wurden im Anschluss an jede qPCR eine Analyse der Schmelzkurve sowie eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da aufgrund von Basenunterschieden der einzelnen Organismen unterschiedliche Schmelzkurven resultieren können, wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, ob nur ein spezifisches Produkt in der PCR amplifiziert wurde. Die Analyse der Schmelzkurven sowie die Gelelektrophorese bestätigten die Spezifität der jeweiligen qPCR.

C.3.5. Quantifizierung der DNS-Matrizen der Inkubationen JV-2 und S4

Die Quantifizierung mittels qPCR erfolgte unter der Verwendung von allgemeinen 16S-rRNS-Primern, sowie mit den Primerpaaren Dfm58F/Dfm129R und DEM116F/DfmI227R. Um die Konzentrationsänderung der DNS im zeitlichen Verlauf der Inkubation aufzuzeigen, wurden die Ergebnisse der qPCR für die allgemeine 16S-rRNS in Kopienzahl pro Gramm Sediment berechnet. Die DNS-Konzentration der SRM wurde hingegen im Verhältnis zur allgemeinen 16S-rRNS dargestellt.

C.3.5.1. Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS

Die Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS der Inkubation JV-2 zeigte eine Kopienzahl der DNS-Matrize pro Gramm Sediment zwischen $8,9 \times 10^7$ und $1,6 \times 10^7$ (Abbildung C.10). Das Sediment vor Pasteurisierung wies dabei die höchste Konzentration auf, die Probe nach 70 Stunden Inkubation die niedrigste. Die gemessene Zunahme der Kopienzahl der 16S-rRNS-Matrize bei 20, sowie nach 45 und 94 Stunden Inkubation traten zu jenen Zeitpunkten auf, bei welchen ebenfalls eine Erhöhung der Sulfatreduktionsrate nachgewiesen werden konnte (Abbildung A.3). Der Verlauf der DNS-Konzentration ist in Abbildung C.10 dargestellt.

Die Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS der Inkubation S4 zeigte nach einer anfänglichen Zunahme der Kopienzahl bei 20 Stunden und zwei weiteren Anstiegen bei 35 und 70 Stunden Inkubation, ein Absinken auf ein Minimum bei 82 Stunden (Abbildung C.10). Für diese Inkubation fielen die Anstiege der DNS-Konzentration zeitlich nicht mit der beobachteten Erhöhung der Sulfatreduktionsrate zusammen (Abbildung A.4). Alle Zahlenwerte sind mit den jeweiligen Standardabweichungen im Anhang angeführt.

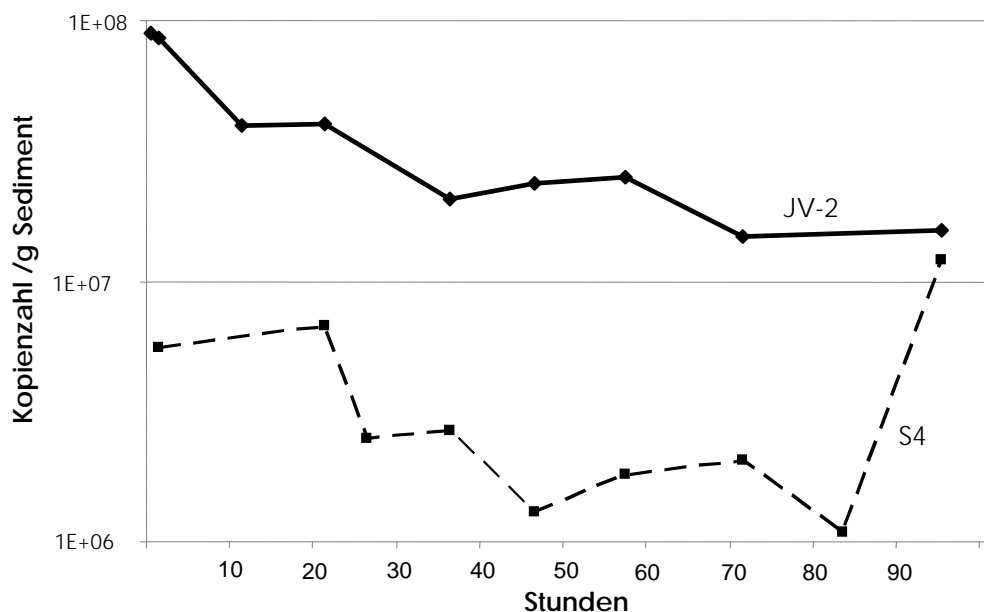


Abbildung C.10: Kopienzahl der DNS-Matrize der allgemeinen 16S-rRNS pro Gramm Sediment der Inkubationsreihen JV-2 und S4.

C.3.5.1. Quantifizierung sulfatreduzierender Mikroorganismen

Die Quantifizierung jener SRM, von welchen angenommen wurde, dass sie für den ersten Anstieg der Sulfatreduktionsrate in der Inkubation mit initialer Substratzugabe verantwortlich waren, wurde mit dem Primerpaar Dfm58F/Dfm129R durchgeführt. Es wurde die Kopienzahl der DNS-Matrizen pro 5 ng eingesetzter DNS berechnet und gegen die Konzentration der allgemeinen 16S-rRNS aufgetragen (Abbildung C.11). Die Organismen waren für die Inkubation JV-2 bereits nach 10 Stunden, für S4 nach 20 Stunden nachweisbar. Die Daten der früheren Zeitpunkte lagen unterhalb der Nachweisgrenze und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Kopienzahl der DNS-Matrize zeigte für beide Inkubationen zwischen 20 und 35 Stunden einen vergleichbaren Anstieg um eine Zehnerpotenz. Bei der Inkubation S4 sank die Konzentration der DNS nach 56 Stunden langsam ab, während sie bei JV-2 ungefähr gleich blieb um nach 94 Stunden den höchsten Wert anzunehmen (4,26E+04 Kopien pro 5 ng DNS).

Für die Inkubation JV-2 machte die DNS der SRM maximal 2,2 % der allgemeinen 16S-rRNS aus, für die Inkubation S4 maximal 2,3 %. Die genauen Werte sind im Anhang angeführt.

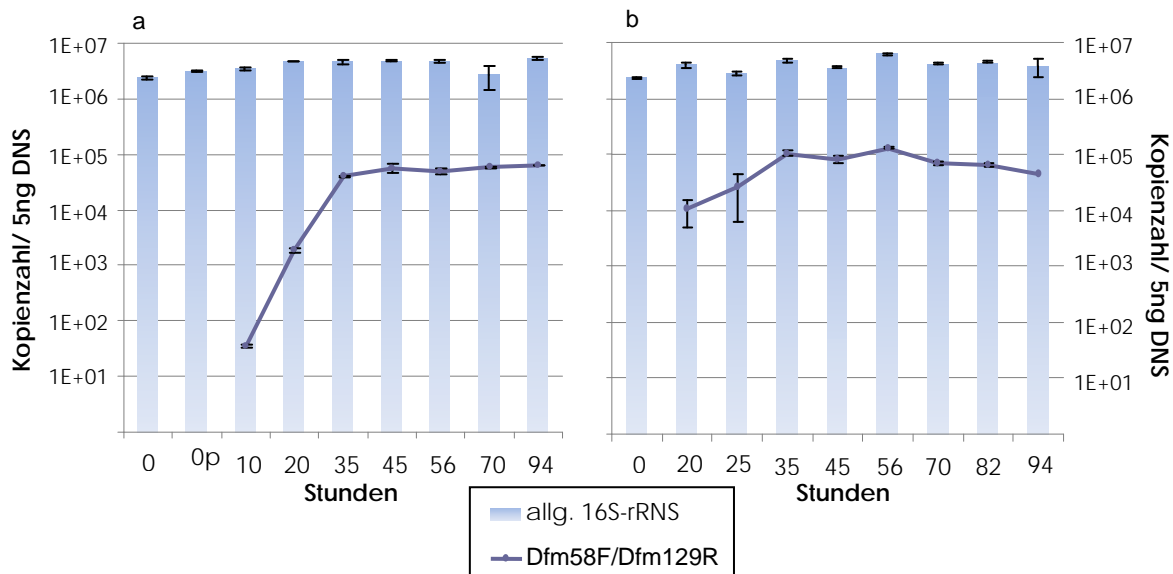


Abbildung C.11: Kopienzahl der DNS-Matrizen der SRM der Inkubationen JV-2 (a) und S4 (b), repliziert mit den Primern Dfm58F und Dfm129R. Zum Vergleich ist die Kopienzahl der allgemeinen 16S-rRNS-Matrizen aufgetragen. Der Zeitpunkt 0 in der Grafik a steht für das Sediment vor Pasteurisierung, 0p für danach. Für jeden Datenpunkt ist die jeweilige Standardabweichung aufgetragen.

Die Quantifizierung der SRM des zweiten Anstiegs nach ungefähr 80 Stunden Inkubation mittels der Primer DEM116F/Dfm1227R und ihren Kompetitoren scheiterte, da der Nicht-Zielorganismus (Klon_149, Konzentration: 1E+07) einen Ct-Wert gleich jenem des Zielorganismus aufwies und somit nicht erfolgreich diskriminiert werden konnte.

D. Diskussion

D.1. DsrAB-basierende Phylogenie von SRM im arktischen Sediment vor Svalbard

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Diversität von SRM der Station AH im arktischen Sediment vor Svalbard mittels DsrAB-Stammbaumanalyse. Der Vergleich mit der bereits analysierten Station J (Barisic 2007) sollte einen Einblick geben, inwieweit die phylogenetische Zusammensetzung dieser beiden Standorte signifikant verschieden war.

Die Isolierung der DNS für die Gen-Datenbank erfolgte bis in eine Tiefe des Sediments von 15 Zentimetern, wodurch SRM tieferer Schichten (Knoblauch *et al.* 1999a) nicht erfasst wurden. Erst bei Durchführung einer „Hot Start PCR“, durch welche die Spezifität der Amplifikation erhöht wurde (Chou *et al.* 1992), war eine Amplifikation des *dsrAB*-Gens möglich.

Die nachfolgende Sequenz-Analyse in ARB zeigte für drei Vollsequenzen der Station AH sowie eine der Station J ein Stop-Codon (Caskey *et al.* 1968) innerhalb des Gens. Dies könnte auf ein Pseudogen (Gerstein und Zheng 2006) oder auf einen Fehler der *Taq*-Polymerase während der Amplifikation zurückzuführen sein.

Durch die Berechnung phylogenetischer Bäume anhand der DsrAB-Sequenzen wurden sieben OTUs der Station J sowie drei OTUs der Station AH gefunden, welche *Desulfobacterium* spp., *Desulfosarcina* spp., *Desulfonema* spp., *Desulfococcus* spp. und *Desulfobacter* spp. als nächste kultivierbare Verwandte aufwiesen. Diese morphologisch sehr diversen mesophilen oder psychrophilen Mikroorganismen aus der Familie der *Desulfobacteraceae* weisen eine strikt anaerobe, chemolithotrophe oder organotrophe Lebensform auf. Viele bewegen sich durch ein Flagellum fort und einige bilden Zellaggregate oder multizelluläre Filamente. Durch ihre Fähigkeit, eine Vielzahl von organischen Verbindungen als Elektronendonoren zu verwenden und bis zu CO₂ zu oxidieren, sowie durch ihre physiologische Anpassungsfähigkeit sind sie in der Lage, sehr verschiedene Habitate zu besiedeln. Dies mag auch der Grund sein, weshalb sie ebenfalls im arktischen Sediment vor Svalbard zu finden sind. Analysen über Diversität und Abundanz in diesem Lebensraum wiesen Vertreter der Gattungen *Desulfosarcina* und *Desulfococcus* als die häufigsten SRM aus (Ravenschlag *et al.* 2000).

OTU 8 und OTU 9 der Station J konnten aufgrund der geringen Sequenzidentität ihrer DSR zu kultivierten SRM nicht eindeutig eingeordnet werden, was mit früheren Analysen übereinstimmt (Barisic 2007). OTU 8 wurde als ein Vertreter der *Deltaproteobacteria* identifiziert, während OTU 9 keinem Phylum zugeordnet werden konnte.

Zwei OTUs der Station AH wiesen in allen angewendeten Baumberechnungsverfahren eine Verwandtschaft zu *Desulfobacterium anilini* und dem Stamm mXyS1 auf. Die *dsrAB*-Sequenzen dieser Organismen werden als mögliche Donoren für Gram-positive *Desulfotomaculum* spp. angesehen (Zverlov *et al.* 2005b), welche diese Sequenz durch lateralen Gentransfer erhalten haben (Klein *et al.* 2001). Somit ist unklar, ob die in dieser Arbeit isolierten *dsrAB*-Sequenzen einen gemeinsamen Ursprung mit *Desulfobacterium anilini* und Stamm mXyS1 aufweisen, oder ob das Gen durch lateralen Gentransfer akquiriert wurde.

Innerhalb der Familie der *Desulfobulbaceae* wurden vier OTUs der Station AH identifiziert, welche eine Verwandtschaft mit beschriebenen Arten der Gattungen *Desulforhopalus* und *Desulfotalea* aufwiesen. Psychrophile Vertreter dieser Gattungen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf und sind großteils nicht frei beweglich. Als Elektronendonoren können sie Laktate, Ethanole und - in Anwesenheit von Azetaten – auch H₂ verwerten, sowie weitere artspezifische organische Verbindungen (Knoblauch *et al.* 1999b). Alle bisher beschriebenen Arten der Gattung *Desulfotalea* wurden aus arktischem Sediment vor Svalbard isoliert (Knoblauch *et al.* 1999b).

Jeweils ein OTU der Station AH sowie der Station J konnten der Familie *Syntrophobacteraceae* zugeordnet werden. Manche SRM dieser Familie sind in der Lage, Sulfat, Sulfit, Thiosulfat (Sievert und Kuever 2000) und ebenfalls elementaren Schwefel (Tanaka *et al.* 2000; Rozanova *et al.* 2001) als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden. Als Elektronendonoren dienen den Bakterien dabei eine Vielzahl an organischen Verbindungen, unter anderem auch Azetate und Aromate. Alle bisher beschriebenen SRM innerhalb dieser Familie sind thermo-, bzw. mesophil. Die in dieser Arbeit beschriebenen OTUs deuten daher auf eine dormante Form dieser Organismen oder auf psychrophile Vertreter innerhalb der Familie der *Syntrophobacteraceae* hin. Die 16S-rRNS-basierende Stammbaumanalyse, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, indiziert ebenfalls das Vorliegen von Sporen thermophiler Organismen in diesem Habitat

OTU 13 der Station J (Barisic 2007) wies keinerlei Verwandtschaft zu kultivierten SRM auf und ist dem Phylum *Proteobacteria* zuzuordnen, sofern das *dsrAB*-Gen nicht durch lateralen Gentransfer übertragen wurde.

OTU 9 der Station AH wies eine phylogenetische Ähnlichkeit mit den Gattungen *Desulfotomaculum* und *Thermodesulfobium* auf, deren Vertreter ihr *dsrAB*-Gen durch lateralen Gentransfer erhalten haben (Klein *et al.* 2001). Somit kann nicht eindeutig geklärt werden, ob das *dsrAB*-Gen von OTU 9 zur Donor-Linie für diese Gattungen gehört, oder ebenfalls durch lateralen Gentransfer akquiriert wurde.

Aus arktischem Sediment vor Svalbard konnte bereits *Desulfotomaculum arcticum* isoliert werden, ein thermophiles Bakterium, welches kein Wachstum bei *in situ*-Temperaturen zeigt (Vandieken *et al.* 2006). Es wurde daher angenommen, dass dieser SRM im kalten Sediment in sporulierter Form vorliegt.

Die *dsrAB*-Sequenzen zweier OTUs der Station AH gruppierten mit jenen der Gattung *Thermodesulfovibrio* aus dem Phylum der *Nitrospira*. Für diese Gattung beschriebene Arten sind thermophil und können Sulfat und Thiosulfat (Henry *et al.* 1994; Sonne-Hansen und Ahring 1999) und sogar Arsenat (Haouari *et al.* 2008) als terminalen Elektronenakzeptor sowie Laktat, Pyruvat, Formiat und H₂ als Elektronendonoren verwenden. Die SRM konnten dabei aus terrestrischen heißen Quellen (Henry *et al.* 1994; Sonne-Hansen und Ahring 1999; Haouari *et al.* 2008) sowie aus methanhaltigem Klärschlamm (Sekiguchi *et al.* 2008) isoliert werden. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit isolierten OTUs aus arktischem Meeressediment sind möglicherweise ebenfalls erklärbar durch ein Überdauerungsstadium der Bakterien oder durch unbeschriebene psychrophile SRM innerhalb der *Nitrospira*.

Die Mehrheit der gefundenen OTUs der Station J ist tiefzweigend und monophyletisch und weist keine Verwandtschaft zu kultivierbaren SRM auf (Barisic 2007). Die *dsrAB*-Sequenzen dieser Gruppe sind phylogenetisch ähnlich zu drei OTUs der Station AH sowie zu beschriebene Sequenzen, welche aus verschiedenen marinen Habitaten (Fukuba *et al.* 2003; Leloup *et al.* 2006; Liu *et al.* 2003; Lloyd *et al.* 2006; Loy *et al.* 2004; Musmann *et al.* 2005; Thomsen *et al.* 2001), einem sauren Torfmoor (Schmalenberger *et al.* 2007), kontaminiertem Grundwasser (Chang *et al.* 2001; Bagwell *et al.* 2006), sowie aus eutrophischen und reinen Erdproben (Castro *et al.* 2002) isoliert werden konnten. Das Überleben dieser Organismen in den verschiedenen, zum Teil extremen Lebensräumen, lässt auf eine hohe Anpassungsfähigkeit dieser phylogenetischen

Gruppe schließen, sofern das *dsrAB*-Gen nicht durch lateralen Gentransfer erworben wurde.

Die Analyse der Datenbanken mittels Libshuff ergab, dass die Station AH nicht signifikant verschieden zu Station J ist, während UniFrac die mikrobielle Zusammensetzung beider Standorte als signifikant verschieden ansah. Dieser Unterschied kann methodische Gründe haben, aber auch darauf zurückzuführen sein, dass für die Libshuff-Analyse nur Vollsequenzen verwendet wurden, während in die UniFrac-Analyse ebenfalls alle Kurzsequenzen der Station AH einfließen.

Die Linien-spezifische Analyse auf OTU-Ebene mittels UniFrac ergab innerhalb der Familie der *Desulfobacteraceae* sowie innerhalb der beschriebenen monophyletischen Gruppe einen signifikanten Unterschied. Für OTU 17 der Station AH und OTU 4 der Station J werden mehr Sequenzen an diesen Stellen erwartet, für OTU 3 der Station AH sowie für OTU 12 der Station J weniger. Die für die letztgenannten OTUs relativ hohe Anzahl an *dsrAB*-Sequenzen kann auf systematische Fehler der Amplifikation zurückzuführen sein (Polz und Cavanaugh 1998), aber auch auf eine höhere Abundanz dieser SRM im Sediment, da gezeigt werden konnte, dass relative Häufigkeiten in einer Genbank jenen von FISH ähneln (Acinas *et al.* 2005; Juretschko *et al.* 2002).

D.4. 16S-rRNS-basierende Phylogenie der mikrobiellen

Diversität im arktischen Sediment vor Svalbard

Die Analyse der 16S-rRNS-Sequenzen des bei 50 °C inkubierten Sediments ergab eine Anreicherung thermophiler fermentativer Bakterien, da durch Pasteurisierung des Sediments vor Inkubation alle psychrophilen Mikroorganismen abgetötet wurden. So wurden Sequenzen isoliert, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Vertretern der Gattungen *Tepibacter* (Slobodkin *et al.* 2003; Urios *et al.* 2004), *Caloranaerobacter* (Wery *et al.* 2001) und *Garciella* (Miranda-Tello *et al.* 2003) aufwiesen. Diese Gattungen beinhalten thermophile Organismen, welche Kohlenhydrate und Proteine zu kurzkettigen freien Fettsäuren abbauen und somit SRM Elektronendonoren zur Verfügung stellen. Die analysierten Sequenzen thermophiler Bakterien weisen auf das Vorliegen von Sporen dieser Organismen im arktischen Sediment vor Svalbard hin, welche bei höheren Temperaturen auskeimen. Phylogenetische Analysen von 16S-rRNS-Sequenzen, welche unter ähnlichen Bedingungen isoliert wurden, zeigen vergleichbare Ergebnisse (Hubert *et*

al. 2009). Zusätzlich werden in dieser Studie Sequenzen beschrieben, welche eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit zur Gattung *Caminicella* aufweisen. Vertreter der beschriebenen Linien sind mit Ölreservoirs oder heißen marinen Quellen assoziiert, welche möglicherweise durch einen konstanten jährlicher Eintrag von ungefähr 10^8 m^{-2} Sporen in das arktische Sediment den Ursprung der thermophilen Organismen in diesem Habitat darstellen (Hubert *et al.* 2009).

Eine Vielzahl der analysierten Sequenzen konnte der Gattung *Desulfotomaculum* zugeordnet werden, thermophile SRM aus der Klasse *Clostridia*. Die Linien-spezifische Analyse mittels UniFrac zeigte, dass sich die mikrobielle Zusammensetzung der Datenbanken nach 20 und nach 80 Stunden Inkubation ausschließlich innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum* signifikant unterschied. Die Analyse der übrigen Sequenzen ergab, einen geringfügig signifikanten, bzw. keinen Unterschied. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Temperatur von 50 °C im Sediment vorliegenden Sporen von *Desulfotomaculum* spp. (Vandieken *et al.* 2006) zur Auskeimung bringen und die gemessene Zunahme der Sulfatreduktionsraten auf Bakterien dieser Gattung zurückzuführen ist.

D.3. Abundanz thermophiler sporenbildender SRM in zwei Inkubationen von arktischem Sediment bei 50 °C

Mehr als 90 % des Meeresbodens weist eine Temperatur von unter 4 °C auf (Levitus und Boyer 1994). Dieses extreme Habitat ist Lebensraum von psychrophilen Mikroorganismen, welche durch ihre Physiologie an ihre kalte Umwelt angepasst sind. Dennoch sind durch die Bildung von Endosporen einige thermophile Vertreter aus dem Phylum *Firmicutes* in der Lage, in diesem kalten Habitat zu überdauern (Isaksen *et al.* 1994; McBee und Gaugler 1956; Vandieken *et al.* 2006). Die Quantifizierung dieser Organismen erweist sich als schwierig, da sie in sehr geringer Zahl im Sediment vorkommen (Sahm *et al.* 1999b) und durch traditionelle Diversitätsstudien nicht erfasst werden (Pedros-Alio 2006; Sogin *et al.* 2006).

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung thermophiler SRM im Verlauf der Inkubationsreihen JV-2 und S4 mittels qPCR. Die Inkubationen - durchgeführt an der Abteilung für Marine Mikrobiologie am Max Planck Institut in Bremen - erfolgten mit arktischem Sediment von Smeerenburgfjorden (Station J) bei einer Temperatur von 50 °C

für 94 Stunden. Psychrophile Organismen wurden zuvor mittels Pasteurisierung bei 80 °C abgetötet. Die Sulfatreduktionsrate wurde während des gesamten Zeitraumes gemessen und Proben zu vorgegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Inkubation JV-2 erfolgte ausschließlich mit Sediment, während der Inkubation S4 initial jeweils 1 mM an organischen Substraten beigemischt wurde.

Um alle Mikroorganismen im Verlauf der Inkubationsreihen zu erfassen, musste zuerst eine Methode zur Extraktion der DNS entwickelt werden, mit der sowohl die Sporen aufgebrochen werden konnten, als auch die DNS der vegetativen Zellen amplifizierbar blieb. Im Vergleich zur chemischen Lyse erwies sich der mechanische Aufschluss der Sporen am effizientesten, was frühere Analysen bestätigen (Kuske *et al.* 1998). Die Austestung der Extraktionsmethode erfolgte an den Sporen von *D. arcticum*. Da *D. arcticum* in der Reinkultur allerdings ebenfalls in vegetativer Form vorlag, wurde versucht, die DNS der Zellen durch Erhitzen und anschließendem DNase-Verdau aus der Probe zu entfernen. Trotz dieser Vorbehandlung der Reinkultur von *D. arcticum* konnte dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die DNS vegetativer Zellen erfolgreich entfernt wurde. In einer zukünftigen Analyse kann durch die Anwendung des DNase-Verdaus auf vegetative Zellen Gram-positiver Bakterien der Beweis erbracht werden, dass die DNS vegetativer Zellen durch diese Methode erfolgreich entfernt werden kann, sofern in der nachfolgenden PCR kein Amplifikat erzielt wird.

Die zeitgleiche Austestung der Extraktionsmethode an den Gram-positiven Organismen *B. subtilis* und *M. luteus* sowie an dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* bewies dass die DNS verschiedener vegetativer Zellen amplifizierbar blieb.

Um eine Hemmung der nachfolgenden Quantifizierungen mittels qPCR durch inhibitorische Stoffe der DNS-Extrakte auszuschließen (Stubner 2002; Simmons *et al.* 2007), wurde eine Verdünnungsreihe der DNS-Lösung hergestellt und anschließend eine qPCR mit allgemeinen 16S-rRNS-Primern durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Amplifizierung der Umwelt-DNS gleich ist mit jener der Standards und somit nicht mit einer Hemmung der im Anschluss durchgeführten qPCRs zu rechnen war. Einzig die Verdünnung der Probe, welche nach 94 Stunden der Inkubation JV-2 entnommen wurde, lag außerhalb des untersuchten Bereichs. Somit kann für diese Probe die Hemmung der PCR durch die eingesetzte Umwelt-DNS nicht ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung der DNS erfolgte mit den allgemeinen 16S-rRNS-Primern 1389Vs/1492R, dem Primerpaar DEM116F/DfmI227R für SRM isoliert nach 80 Stunden

Inkubation, und den Primern Dfm58F/Dfm129R spezifisch für SRM isoliert nach 20 Stunden Inkubation.

Die 16S-rRNS-Analyse zeigte, dass die Primer DEM116F/DfmI227R zu den Sequenzen isoliert nach 20 Stunden Inkubation jeweils eine Basenfehlpaarung am 3'-Ende aufwiesen. Entsprechende Kompetitoren sollten diese Organismen diskriminieren, um die ausschließliche Amplifikation der DNS, extrahiert aus Proben nach 80 Stunden Inkubation, zu gewährleisten. Trotz einer energetisch starken Basenfehlpaarung und des Einsatzes der Kompetitoren konnten die Nicht-Zielorganismen nicht erfolgreich diskriminiert werden.

Es muss bei der Aufarbeitung der qPCR-Daten immer bedacht werden, dass diese Methode vielen Fehlerquellen unterworfen ist (Stubner 2002) und eine exakte Rückrechnung auf die Zelldichte oder Biomasse nicht möglich ist (Wallenstein und Vilgalys 2005). Dennoch wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien die Rückrechnung auf eine mögliche Zellzahl durchgeführt. Mit der Annahme, dass in jeder Zelle zwischen 1 und maximal 15 Genkopien des 16S-rRNS-Gens vorliegen, wurde in dieser Arbeit die Zellzahl mit 3,6 Genkopien berechnet.

Die Ergebnisse der qPCR der allgemeinen 16S-rRNS wurden in Kopienzahl pro Gramm Sediment angegeben, um einen Überblick über den Verlauf der DNS-Konzentration während der Inkubationen zu erhalten. Die Ergebnisse der qPCR spezifisch für die SRM sind im Verhältnis zur allgemeinen 16S-rRNS angegeben.

Die Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS der Inkubation JV-2 zeigte eine maximale DNS-Konzentration vor Beginn der Inkubation, wobei die Kopienzahl der DNS-Matrize pro Gramm Sediment nach Pasteurisierung leicht abnahm. Im weiteren Verlauf sank die 16S-rRNS-Gene-Abundanz bis zum Ende der Inkubation kontinuierlich ab, mit einem kurzen Anstieg bei 20 und bei 56 Stunden. Die Kopienzahl lag dabei immer bei $E+07$ pro Gramm Sediment. Für die Inkubation JV-2 lag die berechnete Zellzahl zwischen $2,48E+07$ zu Beginn der Inkubation und bei $4,14 E+06$ gegen Ende. Quantitative Analysen in diesem Habitat geben eine höhere Zahl von ungefähr $E+09$ Zellen an (Ravenschlag *et al.* 2000).

Der Anstieg der DNS-Konzentration bei 20 und 56 Stunden Inkubation korrelierte zeitlich mit einer Erhöhung der Sulfatreduktionsrate (Abbildung A.3) und indiziert das Wachstum von SRM zu diesen Zeitpunkten.

Nach 10 Stunden Inkubation waren mit den Primern Dfm58F und Dfm129R erstmals SRM quantifizierbar. Die Kopienzahl dieser DNS-Matrize stieg innerhalb von 25 Stunden um mehr als das Doppelte an, um dann den Rest der Inkubation relativ konstant zu bleiben. Das erstmalige Auftreten dieser SRM bei 10 Stunden korrelierte mit der leicht ansteigenden Sulfatreduktionsrate ab diesem Zeitpunkt (Abbildung A.3). Nach 35 Stunden Inkubation war die Sulfatreduktionsrate erstmals wieder abgesunken, während das Ergebnisse der qPCR eine weitaus höhere DNS-Konzentration der Sequenzen der SRM als zu den Zeitpunkten davor zeigten. Es besteht die Möglichkeit, dass die durch diese qPCR erfassten SRM für den nachfolgenden minimalen Anstieg der Sulfatreduktionsrate nach ungefähr 40 Stunden Inkubation verantwortlich waren (Abbildung A.3).

Die Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS für die Inkubation S4 ergab eine durchschnittliche Kopienzahl der DNS-Matrize von $E+06$ pro Gramm Sediment. Die berechnete Zellzahl lag durchschnittlich bei $1,1E+06$. Zu Beginn der Inkubation stieg die Kopienzahl der DNS-Matrize an, um nach einem Maximum bei 20 Stunden wieder abzusinken. Nach Erreichen der niedrigsten Konzentration bei 82 Stunden stieg die Kopienzahl im Anschluss wiederum stark an, um ein Maximum von $E+07$ zu erreichen. Die anfänglich höhere Konzentration der allgemeinen 16S-rRNS mit anschließendem Abfall könnte darauf zurückzuführen sein, dass die DNS der durch die Pasteurisierung abgestorbenen psychrophilen Bakterien noch in den Proben nachweisbar war und erst im zeitlichen Verlauf der Inkubation abgebaut wurde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die DNase-Aktivität in marinem Sediment höher ist als in der Wassersäule und die DNS im Sediment somit schneller abgebaut werden kann (Dell'Anno und Corinaldesi 2004). Der Anstieg der 16S-rRNS-Konzentration bei 20 Stunden kann durch zusätzlich vermehrtes Wachstum thermophiler SRM herrühren, deren DNS zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Inkubation ohne initiale Substratbeigabe eine höhere Konzentration aufwies (Abbildung C.11). Der Anstieg der allgemeinen 16S-rRNS nach 82 Stunden Inkubation korrelierte zeitlich mit einer gemessenen Erhöhung der Sulfatreduktionsrate auf bis zu 2000 nmol pro Kubikzentimeter und Tag.

Die Quantifizierung der SRM des ersten Anstiegs der Sulfatreduktionsrate für die Inkubation S4 erfolgte mit den Primern Dfm58F und Dfm129R. Die Sequenzen dieser Organismen waren erstmals bei 20 Stunden Inkubation quantifizierbar und die Kopienzahl stieg innerhalb von 15 Stunden um eine Zehnerpotenz an, um nach 56 Stunden Inkubation langsam wieder abzusinken. Obwohl die gemessene Sulfatreduktionsrate für diese

Inkubation nach 40 Stunden auf null abgesunken war (Abbildung A.4), war die DNS der SRM die ganze Inkubation über nachweisbar.

Der Vergleich der Ergebnisse der qPCR für JV-2 und S4 zeigte für die allgemeine 16S-rRNS einen Unterschied der Kopienzahl von einer Zehnerpotenz. Da für beide Inkubationen dasselbe Sediment verwendet wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Differenz auf einen Fehler während der Quantifizierung zurückzuführen war. So konnte bereits gezeigt werden, dass einmaliges Einfrieren und Auftauen von Standards mit bekannter DNS-Konzentration zu einer Abnahme der Kopienzahl von einer Zehnerpotenz führt (Lebherz-Eichinger, unpublizierte Daten).

Der Vergleich der DNS-Konzentrationen der SRM im Verhältnis zur allgemeinen 16S-rRNS zeigte für beide Inkubationen einen ähnlichen Verlauf. Die Bakterien waren mit den Primern Dfm58F/Dfm129R in der Inkubation JV-2 bereits nach 10 Stunden nachweisbar, was den Schluss nahe legt, dass sie ebenfalls in der Inkubation S4 ab diesem Zeitpunkt quantifizierbar sind, wofür allerdings keine Probe entnommen wurde. Da die Sequenzen dieser Organismen vor Inkubation nicht amplifizierbar waren, wäre interessant, ab welchem Zeitpunkt in der Inkubation sie erstmals nachweisbar sind, was eine zeitlich dichtere Probenentnahme zu Beginn der Inkubation voraussetzt.

Die DNS-Konzentration der SRM stieg für beide Inkubationen zwischen 20 und 35 Stunden um etwa eine Zehnerpotenz an, wobei die DNS-Konzentration der Inkubation S4 bei 20 Stunden höher lag. Der weitere Verlauf der DNS-Konzentration der SRM beider Inkubationen war vergleichbar.

D.4. Auswirkung initialer Substratzugabe auf bakterielles Wachstum

Endosporen benötigen zur Auskeimung eine entsprechende Menge an Nährstoffen und Substraten (Setlow 2003), welche bei mikrobieller Fermentation entstehen und im Sediment vor Svalbard nur in geringen Konzentrationen von wenigen μM zu finden sind (Finke und Jørgensen 2008). Die Ergebnisse der Quantifizierung der SRM im Rahmen dieser Arbeit zeigten zum Zeitpunkt 20 für die Inkubation S4 eine höhere DNS-Konzentration, was auf eine schnellere Auskeimung thermophiler Bakterien bei Zugabe von Substraten hindeutet.

Inkubationen von arktischem Sediment über einen Temperaturgradienten zeigten im zeitlichen Verlauf eine Steigerung der Sulfatreduktionsrate durch psychophile SRM in einem mittleren Temperaturbereich von 5 bis 35 °C (Finke und Jørgensen 2008). Es ist unklar, ob diese Erhöhung der Sulfatreduktion bei länger dauernder Inkubation durch eine gesteigerte Wachstumsrate psychophiler SRM zustande kam und somit auf eine größere mikrobielle Population zurückzuführen war, oder von einer gesteigerten metabolischen Aktivität der Bakterien herrührte. Für psychophile SRM in Reinkulturen konnten jedenfalls gesteigerte Sulfatreduktionsraten bei höheren Temperaturen gefunden werden, welche über dem für das Wachstum der Bakterien benötigten optimalen Temperaturbereich lagen (Knoblauch und Jørgensen 1999). Vergleichbare Effekte konnten auch für methanogene Bakterien beobachtet werden (Miller *et al.* 1988). Mesophile SRM hingegen wiesen ähnliche Temperaturoptima für Wachstum und Sulfatreduktion auf (Isaksen und Jørgensen 1996; Finke und Jørgensen 2008).

Finke und Jørgensen (2008) erfassten durch ihre Inkubation des arktischen Sediments möglicherweise auch die in dieser Arbeit untersuchten thermophilen SRM, worauf ein zweiter Anstieg der Sulfatreduktion bei ca. 40 °C hindeutete. Während einer Inkubation von arktischem Sediment bei denselben hohen Temperaturen konnte allerdings kein bakterielles Wachstum innerhalb von 10 Tagen nachgewiesen werden (Finke und Jørgensen 2008), was auf eine Erhöhung der metabolischen Aktivität von SRM hindeutet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung thermophiler SRM zeigte im zeitlichen Verlauf eine vergleichbare Gen-Abundanz für beide Inkubationen, während die Sulfatreduktionsrate bei initialer Substratzugabe um ein vielfaches höher lag (Abbildungen A.3 und A.4).

Zusammenfassend scheint die zusätzliche Substratzugabe weniger Auswirkung auf die Wachstumsrate als auf die metabolische Aktivität thermophiler SRM zu haben.

D.5. Änderung der Substratkonzentrationen im zeitlichen Verlauf der Inkubation von arktischem Sediment bei 50 °C

Kurzkettige Fettsäuren und H₂ sind Endprodukte vieler mikrobieller Fermentationsprozesse und dienen oxidierenden Mikroorganismen als Energiequelle. Sie werden von fermentativen Bakterien gebildet und sind im arktischen Sediment nur in geringen Mengen zu finden, da sie durch mikrobielle Oxidation schnell verbraucht werden. Oxidierende Bakterien, wie z.B. SRM werden daher in diesem Habitat durch das geringe Angebot an Elektronendonoren limitiert (Finke und Jørgensen 2008).

Finke und Jørgensen (2008) beschreiben für ihren Inkubations-Versuch von arktischem Sediment über einen Temperaturgradienten einen steilen Anstieg von H₂ und kurzkettigen Fettsäuren ab einer Temperatur von ungefähr 30 °C, was sie mit einer höheren Temperaturtoleranz der psychophilen fermentativen Bakterien gegenüber den substratverbrauchenden SRM erklären.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Messungen der Substratkonzentrationen nach initialer Zugabe von jeweils 1 mM im zeitlichen Verlauf einer Inkubation bei 50 °C. Die Inkubation des arktischen Sediments von Smeerenburgfjorden (Station J) wurde am Institut für Marine Mikrobiologie am Max Planck Institut in Bremen durchgeführt. Das Sediment wurde vor Beginn des Versuchs pasteurisiert, um das ausschließliche Vorliegen thermophiler sporenbildender Organismen zu gewährleisten. Die erhaltenen Messwerte zeigten eine Erhöhung der Konzentration für Azetat und Propionat, während die der übrigen Substrate absank (Abbildung D.1).

Es besteht die Möglichkeit, dass der von Finke und Jørgensen (2008) beobachtete Anstieg kurzkettiger Fettsäuren bei höheren Temperaturen ohne vorangegangene Pasteurisierung auf thermophile Bakterien zurückzuführen war, welche bei *in-situ* Temperaturen in sporulierter Form vorlagen.

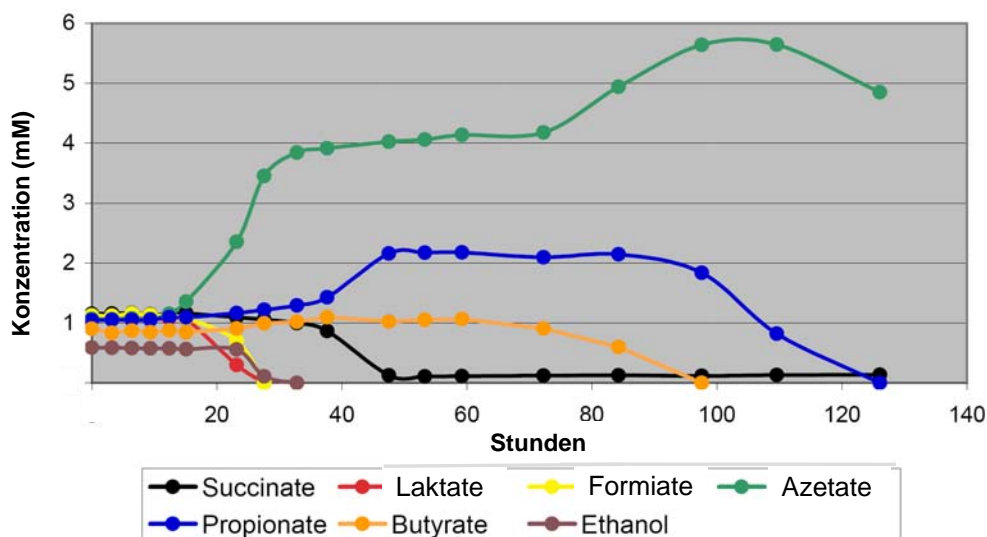


Abbildung D.1: Konzentrationsverlauf organischer Substrate gemessen während einer Inkubation des Sediments der Station J bei 50 °C nach vorangegangener Pasteurisierung. (Grafik: Casey Hubert, Marine Mikrobiologie, Max Planck Institut, Bremen)

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung von SRM mittels qPCR zeigte ein Anwachsen der Mikroorganismen nach ungefähr 20 Stunden Inkubation (Abbildung C.11), was zeitlich mit der gemessenen Konzentrationsänderung von Azetat korrelierte. Diese Konzentrationsänderung kann auf eine unvollständige Sulfatreduktion zurückzuführen sein, aber auch durch mikrobielle Fermentation erklärt werden. Die phylogenetische 16S-rRNS-Analyse weist ebenfalls auf eine Anreicherung thermophiler fermentativer Bakterien hin.

Die Quantifizierung von thermophilen SRM zeigte für beide Inkubationen, nach einer anfänglichen Erhöhung der Gen-Abundanz, eine gleichbleibende Kopienzahl der DNS-Matrize nach ungefähr 35 Stunden für die restliche Inkubation. Zu demselben Zeitpunkt waren auch die Konzentrationen von drei der Substrate (Laktate, Formiate und Ethanol) gegen null gesunken (Abbildung D.1), was möglicherweise die Stagnation des weiteren bakteriellen Wachstums zur Folge hatte.

E. Zusammenfassung

Mehr als 90 % des Meeresbodens weist eine Temperatur von unter 4 ° C auf und stellt somit einen wichtigen Lebensraum für marine Mikroorganismen dar. Durch DsrAB-Stammbaumanalyse konnte ein Einblick in die Diversität von sulfatreduzierenden Mikroorganismen (SRM) in diesem Lebensraum gewonnen werden. Der Vergleich zweier mariner Standorte vor der Westküste von Svalbard ergab eine unterschiedliche phylogenetische Zusammensetzung. So bildeten die Mehrheit der gefundenen OTUs (67 % der Sequenzen) des Sediment des nördlicher gelegenen Smeerenburgfjorden (Station J) eine tiefzweigende, monophyletische Gruppe, welche keine Verwandtschaft zu kultivierbaren SRM aufwies, während der Großteil der erhaltenen OTUs (52 % der Sequenzen), isoliert aus dem Sediment von van Mijenfjorden (Station AH) den *Deltaproteobacteria* zugeordnet werden konnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Durchführung einer 16S-rRNS-Stammbaumanalyse sowie die Quantifizierung von sporenbildenden, thermophilen Mikroorganismen in arktischem Sediment, isoliert aus zwei Inkubationsreihen bei 50 °C mit, bzw. ohne initialer Zugabe von organischen Substraten.

Die Quantifizierung von thermophilen SRM zeigte für beide Inkubationen nach einer anfänglichen Erhöhung der Gen-Abundanz, eine gleichbleibende Kopienzahl der DNS-Matrize für die restliche Inkubation. Die initiale Substratzugabe schien dabei keinen Einfluss auf das Wachstum der SRM, aber auf ihre metabolische Aktivität zu haben.

Anhand der phylogenetische Analyse konnte die Mehrheit der Sequenzen (54 %), welche mit allgemeinen 16S-rRNS-Primern amplifiziert wurden, der Klasse der *Clostridia* zugeordnet werden. 20 % aller Sequenzen gruppieren dabei innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum*, welche Vertreter beinhaltet, die in der Lage sind durch Endosporen extreme Bedingungen zu überdauern. Des Weiteren wurden Sequenzen identifiziert, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Vertretern der Gattungen *Tepidibacter*, *Caloranaerobacter* und *Garciella* aufwiesen. Diese Linien beinhalten thermophile Organismen, welche Kohlenhydrate und Proteine zu kurzkettigen freien Fettsäuren abbauen und somit SRM Elektronendonoren zu Verfügung stellen. Einige Vertreter dieser Linien sind mit Ölreservoirs oder heißen marinen Quellen assoziiert, welche möglicherweise den Ursprung der thermophilen Organismen in diesem Habitat darstellen.

F. Summary

Since 90 % of the marine sediment has a temperature below 4 °C it is a very important habitat for microorganisms. It was possible to gain insight into the diversity of sulfate reducing bacteria (SRB) in this habitat by analysing DsrAB-sequences. The comparison of two different fjord sediments on the west coast of Svalbard in the Arctic showed differences in the phylogeny of SRB. Most (67 %) of the sequences obtained from the northern Smeerenburgfjorden sediment (station J), showed no affinity to cultivated SRB and generated a monophyletic, deeply branching group within the tree. However, the majority the sequences (52 %) obtained from sediment of the southern van Mijenfjorden (Station AH) were related to the *Deltaproteobacteria*.

Another aim of this study was the phylogenetic analysis and quantification of thermophilic, spore-forming microorganisms obtained from two incubations of arctic sediment at 50 °C. Volatile fatty acids (VFA) were added to one incubation at the beginning of the experiment.

The quantification of the SRB showed an increase of 16S-rRNA gene abundance at the beginning of incubation. After this the gene abundance remained constant. Initial adding VFA seemed to have no effect on the growth rate but on the metabolic activity of the bacteria.

The phylogenetic analysis showed that most of the sequences (54 %) - amplified with general 16S-rRNS-primers - belong to the class *Clostridia*. 20 % of all sequences grouped within the genus *Desulfotomaculum*, which are able to form endospores and are assumed to cause the increase of sulphate reduction at 50 °C.

Moreover, sequences were identified which show a high similarity to bacteria of the genera *Tepidibacter*, *Caloranaerobacter* and *Garciella*. These lineages contain thermophilic microorganisms able to catabolize carbohydrates and proteins to VFA that serve as electron-donors for SRB. Some microorganisms of these genera are associated with oil reservoirs or hydrothermal vents, which may serve as sources for the thermophilic population in the arctic sediment.

G. Literaturverzeichnis

Abdelouas A., W. Lutze, W. Gong, E. H. Nuttall, B. A. Strietelmeier, B. J. Travis (2000). "Biological reduction of uranium in groundwater and subsurface soil." Sci Total Environ **250**(1-3): 21-35.

Abdi H (2007). "Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons." N.J. Salkind (ed.) Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks, CA: Sage

Abreu I. A., L. M. Saraiva, J. Carita, H. Huber, K. O. Stetter, D. Cabelli, M. Teixeira (2000). "Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by neelaredoxin." Mol Microbiol **38**(2): 322-34.

Achtziger R., U. Nigman, H. Zwölfer (1992). "Rarefaction-Methoden und ihre Einsatzmöglichkeiten bei der zooökologischen Zustandsanalyse und Bewertung von Biotopen." Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz **1**: 89-105.

Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.

Arnosti C., Jørgensen BB, Sageman J, Thamdrup B. (1998). Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments: polysaccharide hydrolysis, oxygen consumption, and sulphate reduction. Mar Ecol Prog Ser **165**: 59-70

Arnosti C, Jørgensen BB. (2003). "High activity and low temperature optima of extracellular enzymes in Arctic sediments: implications for carbon cycling by heterotrophic microbial communities." Mar Ecol Prog Ser **249**: 15-24

Bagwell C. E., X. Liu, L. Wu, J. Zhou (2006). "Effects of legacy nuclear waste on the compositional diversity and distributions of sulfate-reducing bacteria in a terrestrial subsurface aquifer." FEMS Microbiol Ecol **55**(3): 424-31.

Bahr M., B. C. Crump, V. Klepac-Ceraj, A. Teske, M. L. Sogin, J. E. Hobbie (2005). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh." Environ Microbiol **7**(8): 1175-85.

Barisic I.(2007). „Analyse über die Diversität und Verteilung von sulfatreduzierenden Prokaryoten im arktischen marinen Sediment.“ Diplomarbeit an der Abteilung für mikrobielle Ökologie der Universität Wien

Baumgarten A., I. Redenius, J. Kranczoch, H. Cypionka (2001). "Periplasmic oxygen reduction by *Desulfovibrio* species." Arch Microbiol **176**(4): 306-9.

Beerens H., C. Romond (1977). "Sulfate-reducing anaerobic bacteria in human feces." Am. J. Clin. Nutr. **30**:1770-1776.

Beerli P., J. Felsenstein (1999). "Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach." Genetics **152**(2): 763-73.

Ben-Dov E., O.H. Shapiro, N. Siboni, A. Kushmaro (2006). "Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity" Appl. Environ. Microbiol. **72**(11): 6902-6906

Borresen A. L., E. Hovig, A. Brogger (1988). "Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes." Mutat Res **202**(1): 77-83.

Brosius J., A. Ullrich, M. A. Raker, A. Gray, T. J. Dull, R. R. Gutell, H. F. Noller (1981). "Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*." Plasmid **6**(1): 112-8.

- Casey H., Loy A., Nickel M., Arnosti C., Ferdelman T., Baranyi C., Christensen F. M., Finster K., Vandieken V., Brüchert V., Jørgensen B. B. (2009). „A Constant Flux of Diverse Thermophilic Bacteria into the Cold Arctic Seabed.“ Science **325**(5947): 1541-1544
- Caskey C. T., R. Tompkins, E. Scolnick, T. Caryk, M. Nirenberg (1968). "Sequential translation of trinucleotide codons for the initiation and termination of protein synthesis." Science **162**(849): 135-8.
- Castro H., K. R. Reddy, A. Ogram (2002). "Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades." Appl Environ Microbiol **68**(12): 6129-37.
- Chao A. (1984). „Non-parametric estimation of the number of classes in a population.“ Scand. J. Statistics **11**: 265-270.
- Chang Y. J., A. D. Peacock, P. E. Long, J. R. Stephen, J. P. McKinley, S. J. Macnaughton, A. K. Hussain, A. M. Saxton, D. C. White (2001). "Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site." Appl Environ Microbiol **67**(7): 3149-60.
- Chou Q., M. Russell, D. E. Birch, J. Raymond, W. Bloch (1992). "Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications." Nucleic Acids Res **20**(7): 1717-23.
- Cole J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T.M. Schmidt, G. M. Garrity, J. M. Tiedje (2003). "The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy." Nucleic Acids Res. **31**(1): 442-443.
- Crane B.R., L.M. Siegel, E.D. Getzoff (1995). „Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions.“ Science **270**:59-0
- Cypionka H. (2000). "Oxygen respiration by desulfovibrio species." Annu Rev Microbiol **54**: 827-48.
- Dang H., T. Li, M. Chen, G Huang (2008). "Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters" Appl. Environ. Microbiol. **74**(1): 52-60
- Dell'Anno A., C. Corinaldesi (2004). "Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: ecological and methodological considerations." Appl Environ Microbiol **70**(7): 4384-6.
- Dhillon A., A. Teske, J. Dillon, D.A. Stahl, M.L. Sogin (2003). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin" Appl. Environ. Microbiol. **69** (5): 2765-2772
- Edlund A., F. Hardeman, J.K. Jansson, S. Sjöling (2008). "Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment" Environ. Microbiol. **10**(8): 2051-2063
- Eschermann A., M. Kühl, H. Cypionka (1999). „Aerotaxis in *Desulfovibrio*.“ Environ. Microbiol. **1**(6):489-494.
- Fardeau M.L., B. Ollivier, B.K. Patel, P. Dwivedi, M. Ragot, J.L. Garcia (1995). "Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. nov" Int. J. Syst. Bacteriol. **45**(2): 218-221
- Feller G., C. Gerday (2003). "Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation." Nat Rev Microbiol **1**(3): 200-8.
- Finke N., B. B. Jørgensen (2008). "Response of fermentation and sulfate reduction to experimental temperature changes in temperate and Arctic marine sediments." ISME J **2**(8): 815-29.
- Fitch W. M., E. Margoliash (1967). "Construction of phylogenetic trees." Science **155**(760): 279-84.
- Frias-Lopez J., A.L. Zerkle, G.T. Bonheyo, B.W. Fouke (2002). "Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces" Appl. Environ. Microbiol. **68**(5): 2214-2228

- Fukuba T., M. Ogawa, T. Fujii, T. Naganuma (2003). "Phylogenetic diversity of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea cold seep sediment." Mar Biotechnol (NY) **5**(5): 458-68.
- Gerstein M., D. Zheng (2006). "The real life of pseudogenes." Scientific American
- Gillan D.C., P. Pernet (2007). "Adherent bacteria in heavy metal contaminated marine sediments" Biofouling **23**(1-2): 1-13
- Gittel A., K.B. Sorensen, T.L. Skovhus, K. Ingvorsen, A. Schramm (2009). Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment" Appl. Environ. Microbiol. **75**(22): 7086-7096
- Goldstein E. J., D. M. Citron, V. A. Peraino, S. A. Cross (2003). "Desulfovibrio desulfuricans bacteremia and review of human Desulfovibrio infections." J Clin Microbiol **41**(6): 2752-4.
- Good I. J. (1953). "The population frequency of species and the estimation of population parameters." Biometrika **40**: 237-264.
- Griffiths R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, M. J. Bailey (2000). "Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition." Appl Environ Microbiol **66**(12): 5488-91.
- Hagenauer A., H. Hippe, F.A. Rainey, F.A. (1997). "Desulfotomaculum aeronauticum sp. nov., a spore forming, thiosulfate-reducing bacterium from corroded aluminium alloy in an aircraft" Syst. Appl. Microbiol. **20**:65-71
- Hansen T. A. (1994). "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes." Antonie Van Leeuwenhoek **66**(1-3): 165-85.
- Haouari O., M. L. Fardeau, J. L. Cayol, G. Fauque, C. Casiot, F. Elbaz-Poulichet, M. Hamdi , B. Ollivier (2008). "Thermodesulfovibrio hydrogenophilus sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring." Syst Appl Microbiol **31**(1): 38-42.
- Hartmann M., F. Widmer (2006). "Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices" Appl. Environ. Microbiol. **72**(12): 7804-7812
- Hattori S., Y. Kamagata, S. Hanada, H. Shoun (2000). "Thermacetogenium phaeum gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **50**(4): 1601-1609.
- Henrichs S. M., W. S. Reeburgh (1987). „Anaerobic mineralization of marine sediment organic matter: Rates and the role of anaerobic processes in the oceanic carbon economy.“ Geomicrobiol J **5**:191–237
- Henry E. A., R. Devereux, J. S. Maki, C. C. Gilmour, C. R. Woese, L. Mandelco, R. Schauder, C. C. Remsen, R. Mitchell (1994). "Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium Thermodesulfovibrio yellowstonii, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to Thermodesulfo bacterium commune and their origins deep within the bacterial domain." Arch Microbiol **161**(1): 62-9.
- Huber T., G. Faulkner, P. Hugenholtz (2004). "Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments." Bioinformatics **20**(14): 2317-9.
- Imachi H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Loy, Y. L. Qiu, P. Hugenholtz, N. Kimura, M. Wagner, A. Ohashi, H. Harada (2006). "Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with desulfotomaculum cluster I are widely distributed in methanogenic environments." Appl Environ Microbiol **72**(3): 2080-91.
- Isaksen M. F., Bak F., Jørgensen BB (1994) "Thermophilic sulphate-reducing bacteria in cold marine sediments." FEMS Microbiol. Ecol. **14**: 1-8

- Isaksen M. F., B. B. Jørgensen (1996). "Adaptation of Psychrophilic and Psychrotrophic Sulfate-Reducing Bacteria to Permanently Cold Marine Environments." Appl Environ Microbiol **62**(2): 408-414.
- Isaksen M. F., A. Teske (1996). "Desulforhopalus vacuolatus gen. nov., sp. nov., a new moderately psychrophilic sulfate-reducing bacterium with gas vacuoles isolated from a temperate estuary." Arch Microbiol **166**: 160-168
- Johnson C. C., S. M. Finegold (1987). "Uncommonly encountered, motile, anaerobic gram-negative bacilli associated with infection." Rev Infect Dis **9**(6): 1150-62.
- Jørgensen B. B. (1987). "Ecology of the sulphur cycle: oxidative pathways in sediments." In A. Cole, J. and S. Ferguson The Nitrogen and Sulphur Cycles. Cambridge University Press, **42**:31-63
- Juretschko S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops, M. Wagner (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations." Appl Environ Microbiol **64**(8): 3042-51.
- Kaneko R., T. Hayashi, M. Tanahashi, T. Naganuma (2007). "Phylogenetic diversity and distribution of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea sediment cores" Mar. Biotechnol. **9** (4): 429-436
- Kane M. D., L. K. Poulsen, D. A. Stahl (1993). "Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences." Appl Environ Microbiol **59**(3): 682-6.
- Kjeldsen K.U., Loy A., T.F. Jakobsen, T.R. Thomsen, M. Wagner, K. Ingvorsen (2007). "Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah)" FEMS Microbiol. Ecol. **60**(2): 287-298
- Klein M., M. Friedrich, A. J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L. L. Blackall, D. A. Stahl, M. Wagner (2001). "Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes." J Bacteriol **183**(20): 6028-35.
- Kniemeyer O., T. Fischer, H. Wilkes, F. O. Glockner, F. Widdel (2003). "Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium." Appl Environ Microbiol **69**(2): 760-8.
- Knoblauch C., B. B. Jørgensen (1999). "Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments." Environ Microbiol **1**(5): 457-67.
- Knoblauch C., B. B. Jørgensen, J. Harder (1999a). "Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in Arctic marine sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 4230-3.
- Knoblauch C., K. Sahm, B. B. Jørgensen (1999b). "Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of Desulfofrigus oceanense gen. nov., sp. nov., Desulfofrigus fragile sp. nov., Desulfofaba gelida gen. nov., sp. nov., Desulfotalea psychrophila gen. nov., sp. nov. and Desulfotalea arctica sp. nov." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 4**: 1631-43.
- Krekeler D., A. Teske, H. Cypionka (1998). "Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat." FEMS Microbiol. Ecol. **25**(2): 89-96.
- Krumholz L. R., S. H. Harris, S. T. Tay, J. M. Suflita (1999). "Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, Desulfomicrobium hypogaeum sp. nov. and Acetobacterium psammolithicum sp. nov., and their ecological roles." Appl Environ Microbiol **65**(6): 2300-6.
- Kuever J., F.A. Rainey, H. Hippe (1999). "Description of Desulfotomaculum sp. Groll as Desulfotomaculum gibsoniae sp. nov." Bacteriol. **49**(4): 1801-1808
- Kuske C. R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, P. J. Jackson (1998). "Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil." Appl Environ Microbiol **64**(7): 2463-72.

- La Scola B. , D. Raoult (1999). "Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*." J Clin Microbiol **37**(9): 3076-7.
- Leloup J., L. Quillet, T. Berthe , F. Petit (2006). "Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France." FEMS Microbiol Ecol **55**(2): 230-8.
- Leloup J., H. Fossing, K. Kohls, L. Holmkvist, C. Borowski, B.B. Jørgensen (2009). "Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation" Environ. Microbiol., In press
- Levitus S, Boyer T (1994) World Ocean Atlas, Vol. 4: Temperature. Washington DC: US Department of Commerce
- Li H., Y. Yu, W. Luo, Y. Zeng, B. Chen (2009). "Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean" Extremophiles **13**(2): 233-246
- Liu X., C. E. Bagwell, L. Wu, A. H. Devol , J. Zhou (2003). "Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats." Appl Environ Microbiol **69**(10): 6073-81.
- Lloyd K. G., L. Lapham , A. Teske (2006). "An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments." Appl Environ Microbiol **72**(11): 7218-30.
- Loubinoux J., F. Mory, I. A. Pereira , A. E. Le Faou (2000). "Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*." J Clin Microbiol **38**(2): 931-4.
- Loy A., S. Duller, C. Baranyi, M. Mussmann, J. Ott, I. Sharon, O. Beja, D. Le Paslier, C. Dahl , M. Wagner (2009). "Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes." Environ Microbiol **11**(2): 289-99.
- Loy A., S. Duller, M. Wagner (2008). "Evolution and ecology of microbes dissimilating sulfur compounds: Insights from siroheme sulfite reductases." Microbial Sulfur Metabolism,. (Friedrich C, Dahl C, ed.). Springer, New York. pp. 46-59
- Loy A., K. Küsel, A. Lehner, H. Drake , M. Wagner (2004). "Microarray and Functional Gene Analyses of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Low Sulfate, Acidic Fens Reveal Cooccurrence of Recognized Genera and Novel Lineages." Appl. Environ. Microbiol. **70**(12): 6998-7009.
- Lozniewski A., P. Maurer, H. Schuhmacher, J. P. Carlier , F. Mory (1999). "First isolation of *Desulfovibrio* species as part of a polymicrobial infection from a brain abscess." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**(8): 602-3.
- Lozupone C., M. Hamady , R. Knight (2006). "UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context." BMC Bioinformatics **7**: 371.
- Lozupone C. , R. Knight (2005). "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8228-35.
- Ludwig W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner , K. H. Schleifer (1998). "Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis." Electrophoresis **19**(4): 554-68.
- Ludwig W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode , K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Res **32**(4): 1363-71.
- Madigan M. T., J. M. Martinko, J. Parker (2000). "Brock biology of microorganisms." Prentice-Hall, Inc.

- Martinez R.J., H.J. Mills, S. Story, P.A. Sobecky (2006). "Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico" Environ. Microbiol. **8**(10): 1783-1796
- McBee R. H. , L. P. Gaugler (1956). "Identity of Thermophilic Bacteria Isolated from Arctic Soils and Waters." J Bacteriol **71**(2): 186-7.
- Miller J. F., N. N. Shah, C. M. Nelson, J. M. Ludlow , D. S. Clark (1988). "Pressure and Temperature Effects on Growth and Methane Production of the Extreme Thermophile *Methanococcus jannaschii*." Appl Environ Microbiol **54**(12): 3039-3042.
- Minz D., S. Fishbain, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, B. E. Rittmann , D. A. Stahl (1999). "Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4659-65.
- Musmann M., K. Ishii, R. Rabus , R. Amann (2005). "Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea." Environ Microbiol **7**(3): 405-18.
- Musmann M., M. Richter, T. Lombardot, A. Meyerdierks, J. Kuever, M. Kube, F.O. Glockner, R. Amann (2005b). "Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer" J. Bacteriol. **187** (20): 7126-7137
- Muyzer G., K. Smalla (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Antonie Van Leeuwenhoek **73**(1): 127-41
- Muyzer G., E. C. de Waal, A. G. Uitterlinden (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Appl Environ Microbiol **59**(3): 695-700.
- Muyzer G., A. J. Stams (2008). "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria." Nat Rev Microbiol **6**(6): 441-54.
- Nercessian O., N. Bienvenu, D. Moreira, D. Prieur, C. Jeanthon (2005). "Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments" Environ. Microbiol. **7** (1): 118-132
- Noh S. L., J. M. Choi, Y. J. An, S. S. Park , K. S. Cho (2003). "Anaerobic biodegradation of toluene coupled to sulfate reduction in oil-contaminated soils: optimum environmental conditions for field applications." J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng **38**(6): 1087-97.
- Odom J. M. , H. D. Peck, Jr. (1984). "Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*." Annu Rev Microbiol **38**: 551-92.
- Oude Elferink S. J. W. H., R. N. Maas, H. J. M. Harmsen, A. J. M. Stams (1995). "Desulforhabdus amnigenus gen. nov. sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge." Arch Microbiol **164**: 119-124
- Paisse S., F. Coulon, M. Goni-Urriza, L. Peperzak, T.J. McGenity, R. Duran (2008). "Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment" FEMS Microbiol. Ecol.
- fPedros-Alio C. (2006). "Marine microbial diversity: can it be determined?" Trends Microbiol **14**(6): 257-63.
- Pettitt A. N. (1982). "Cramer-von Mises statistic." Encyclopedia of statistical sciences. a. N. L. J. S. Kotz. New York, Wiley-Interscience: 220-221.
- Pimentel J. D., R. C. Chan (2007). "Desulfovibrio fairfieldensis bacteremia associated with choledocholithiasis and endoscopic retrograde cholangiopancreatography." J Clin Microbiol **45**(8): 2747-50.

- Polz and Cavanaugh (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." Appl. Environ. Microbiol. **64**(10): 3724-3730.
- Porschen R. K., P. Chan (1977). "Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species." J Clin Microbiol **5**(4): 444-7.
- Pruesse E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, F. O. Glockner (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB." Nucleic Acids Res **35**(21): 7188-96.
- Ravenschlag K., K. Sahm , R. Amann (2001). "Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard)." Appl Environ Microbiol **67**(1): 387-95.
- Ravenschlag K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jørgensen , R. Amann (2000). "Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments." Appl Environ Microbiol **66**(8): 3592-602.
- Ravenschlag K., K. Sahm, J. Pernthaler , R. Amann (1999). "High bacterial diversity in permanently cold marine sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3982-9.
- Robador A., V. Brüchert, B. B. Jørgensen (2009). "The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments." Environ Microbiol **11**(7): 1692-1703
- Rozanova E. P., T. P. Turova, T. V. Kolganova, A. M. Lysenko, L. L. Mitushina, S. K. Iusupov , S. S. Beliaev (2001). "[*Desulfacinum subterraneum* sp.nov.--a new thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a high temperature oil field]." Mikrobiologiya **70**(4): 536-42.
- Sageman J, Jørgensen BB. Greif O. (1998). "Temperature dependence and rates of sulphate reduction in cold sediments of Svalbard", Arctic Ocean. Geomicrobiol J **15**: 85-100
- Sahm K., C. Knoblauch , R. Amann (1999a). "Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine Arctic sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3976-81.
- Sahm K., B. J. MacGregor, B. B. Jørgensen , D. A. Stahl (1999b). "Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment." Environ Microbiol **1**(1): 65-74.
- Saitou N., M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.
- Schloss P. D., J. Handelsman (2005). "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1501-6.
- Schmalenberger A., H. L. Drake , K. Kusel (2007). "High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen." Environ Microbiol **9**(5): 1317-28.
- Sen A. M. (2001). "Acidophilic Sulphate Reducing Bacteria: Candidates for Bioremediation of Acid Mine Drainage Pollution." Thesis, Univ. Wales
- Sekiguchi Y., M. Muramatsu, H. Imachi, T. Narihiro, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada , Y. Kamagata (2008). "*Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 11): 2541-8.
- Setlow P. (2003). "Spore germination." Curr Opin Microbiol **6**(6): 550-6.
- Shinozaki K. (1963). "Note on the species-area-curve." Proceedings of the 10th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan.: 5

- Sievert S. M., J. Kuever (2000). "Desulfacinum hydrothermale sp. nov., a thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece)." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 3**: 1239-46.
- Silva G., J. LeGall, A. V. Xavier, M. Teixeira, C. Rodrigues-Pousada (2001a). "Molecular characterization of Desulfovibrio gigas neelaredoxin, a protein involved in oxygen detoxification in anaerobes." J Bacteriol **183**(15): 4413-20.
- Silva G., S. Oliveira, J. LeGall, A. V. Xavier, C. Rodrigues-Pousada (2001b). "Analysis of the Desulfovibrio gigas transcriptional unit containing rubredoxin (rd) and rubredoxin-oxygen oxidoreductase (roo) genes and upstream ORFs." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 491-502.
- Simmons S. L., D. A. Bazylinski, K. J. Edwards (2007). "Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR." Environ Microbiol **9**(9): 2162-74.
- Singleton D. R., M. A. Furlong, S. L. Rathbun, W. B. Whitman (2001). "Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples." Appl Environ Microbiol **67**(9): 4374-6.
- Sogin M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. Mark Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, G. J. Herndl (2006). "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(32): 12115-20.
- Skyring G. W. (1987). "Sulfate reduction in coastal ecosystems." Geomicrobiol J **5**:295–374
- Sonne-Hansen J., B. K. Ahring (1999). "Thermodesulfobacterium hveragerdense sp. nov., and Thermodesulfovibrio islandicus sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring." Syst Appl Microbiol **22**(4): 559-64.
- Stackebrandt E., C. Sproer, F. A. Rainey, J. Burghardt, O. Pauker, H. Hippe (1997). "Phylogenetic analysis of the genus Desulfotomaculum: evidence for the misclassification of Desulfotomaculum guttoideum and description of Desulfotomaculum orientis as Desulfosporosinus orientis gen. nov., comb. nov." Int J Syst Bacteriol **47**(4): 1134-9.
- Stubner S. (2002). "Enumeration of 16S rDNA of Desulfotomaculum lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection." J Microbiol Methods **50**(2): 155-64.
- Sung Y., K. M. Ritalahti, R. A. Sanford, J. W. Urbance, S. J. Flynn, J. M. Tiedje, F. E. Löffler (2003). "Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as Desulfuromonas michiganensis sp. nov." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2964-74.
- Swofford D. L., P. J. Waddell, J. P. Huelsenbeck, P. G. Foster, P. O. Lewis, J. S. Rogers (2001). "Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods." Syst Biol **50**(4): 525-39.
- Tanaka K., E. Stackebrandt, S. Tohyama, T. Eguchi (2000). "Desulfovira adipica gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, gram-negative, sulfate-reducing bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 2**: 639-44.
- Tardy-Jacquenod, M. Magot, B.K. Patel, R. Matheron, P. Caumette (1998). "Desulfotomaculum halophilum sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities" Int. J. Syst. Bacteriol. **48**(2): 333-338
- Tee W., M. Dyal-Smith, W. Woods, D. Eisen (1996). "Probable new species of Desulfovibrio isolated from a pyogenic liver abscess." J Clin Microbiol **34**(7): 1760-4.
- Teske A., K.U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de Vera Gomez, D. Kysela, S.P Sylva, M.L. Sogin, H.W. Jannasch (2002). "Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities" Appl. Environ. Microbiol. **68**(4): 1994-2007
- Thomsen T. R., K. Finster, N. B. Ramsing (2001). "Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment." Appl Environ Microbiol **67**(4): 1646-56.

- Tringe S.G., C. von Mering, A. Kobayashi, A.A. Salamov, K. Chen, H.W. Chang, M. Podar, J.M. Short, E.J. Mathur, J.C. Detter, P. Bork, P. Hugenholtz, E.M. Rubin (2005). "Comparative metagenomics of microbial communities" Science **308**(5721): 554-557
- Urata T., M. Kikuchi, T. Hino, Y. Yoda, K. Tamai, Y. Kodaira, S. Hitomi (2008). "Bacteremia caused by *Desulfovibrio fairfieldensis*." J Infect Chemother **14**(5): 368-70.
- Urios L., V. Cuff, P. Pignet, G. Barbier (2004). "Tepidibacter formicigenes sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent" Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**(2): 439-443
- Vandieken V., C. Knoblauch, B. B. Jørgensen (2006). "Desulfotomaculum arcticum sp. nov., a novel spore-forming, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a permanently cold fjord sediment of Svalbard." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 4): 687-90.
- Wagner M., R. Amann, H. Lemmer, K.-H. Schleifer (1993). „Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure.” Appl. Environ. Microbiol. **59**(5): 1520-1525.
- Wagner M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, D. A. Stahl (1998). "Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration." J. Bacteriol. **180**(11): 2975-2982.
- Wallenstein M. D., J. Vilgalys (2005). „Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils.“ Pedobiologia **49**(6): 665-672.
- Warren Y.A., K.L. Tyrrell, D.M. Citron, E.J. Goldstein (2006). "Clostridium aldenense sp. nov. and Clostridium citroniae sp. nov. isolated from human clinical infections" J. Clin. Microbiol. **44**(7): 2416-2422
- Wegener G., M. Shovitri, K. Knittel, H. Niemann, M. Hovland, A. Boetius (2008). "Biogeochemical processes and microbial diversity of the Gullfaks and Tommeliten methane seeps (Northern North Sea)" Biogeosci. Discuss. **5**:1127-1144
- Widdel F. (1988). "Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria." A. J. B. Zehnder Biology of Anaerobic Microorganisms. John Wiley & Sons. New York, 469–585.
- Widdel F., F. Bak (1992). "Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria." The prokaryotes. (A. Balows et. al.) New York, Springer-Verlag. **3**: 3352–3378.
- Wu X.J., J.L. Pan, X.L. Liu, J. Tan, D.T. Li, H. Yang (2009). "Sulfate-reducing bacteria in leachate-polluted aquifers along the shore of the East China Sea" Can. J. Microbiol. **55** (7): 818-828
- Zhang W., L.S. Song, J. S. Ki, C.K. Lau, X.D. Li, P.Y. Qian (2009) "Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of dsrAB gene" Estuar Coast Shelf Sci **76** (3): 682-691
- Zheng D., E. W. Alm, D. A. Stahl, L. Raskin (1996). "Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies." Appl. Environ. Microbiol. **62**(12):4504-13.
- Zverlov V., M. Klein, S. Lückner, M. Friedrich, J. Kellermann, D. Stahl, A. Loy, M. Wagner (2005). "Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited." J. Bacteriol. **187**(6): 2203-8.

H. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Ω	Ohm
A	Adenin, Ampere
abs.	absolut
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ARB	Softwarepaket für phylogenetische Datenanalyse
ATP	Adenosin-Triphosphat
b	Basen
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin, Kohlenstoff
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaSO ₄	Kalziumsulfat, Gips
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dest.	destilliert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DSR	dissimilatorische (Bi-)Sulfit-Reduktase
<i>dsrAB</i>	Gene der α- und β- Untereinheit der DSR
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat. „und andere“)
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm, Gravitationskraft (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GC	Mol % Guanin + Cytosin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
K	Kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KbL	„Kilobasen-Leiter“, DNS Längenstandard
LB	Luria Bertani
m	milli (10 ⁻³), Meter
M	molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
NaCl ₂	Natriumchlorid

OTU	„Operational taxonomic unit“, Operative taxonomische Einheit
Pa	Pascal
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCR	„Polymerase Chain Reaktion“, Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S ₀	elementarer Schwefel
S ₂ -	Sulfid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SO ₃ ²⁻	Sulfit
SO ₄ ²⁻	Sulfat
S ₂ O ₃ ²⁻	Thiosulfat
S ₄ O ₆ ²⁻	Tetrathionat
sp.	Art
spp.	Arten
SRM	sulfatreduzierender Mikroorganismus
ss	„single stranded“, einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMAC	Tetramethyl-Ammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheit), Uracil
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen

I. Anhang

Übersicht über die Tabellen des Anhangs

Tabelle I.1: Zuordnung der Sequenzen der DsrAB-Datenbank zu den OTUs: Seite 101

Tabelle I.2: Sequenzähnlichkeit der *dsrAB*-Vollsequenzen zu den nächsten: Seite 101

Tabelle I.3: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen (20 Stunden) zu den nächsten Verwandten: Seite 103

Tabelle I.4: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen (80 Stunden) zu den nächsten Verwandten: Seite 105

Tabelle I.5: Auflistung der überlappenden OTUs der beiden Genbanken (20 und 80 Stunden):
Seite 107

Tabelle I.6: Sequenzähnlichkeit der DGGE-Sequenzen zu den nächsten Verwandten: Seite 108

Tabelle I.7: Sequenzähnlichkeit der Sequenzen isoliert mittels nested PCR und DGGE-Analyse zu den nächsten Verwandten: Seite 110

Tabelle I.8: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen (Primer) DEM116F/DEM1164R zu den nächsten Verwandten: Seite 111

Tabelle I.9: Übersicht über die zur DGGE- Analyse verwendeten Primer: Seite 112

Tabelle I.10: Spezifität des Primers DEM116F: Seite 112

Tabelle I.11: Spezifität des Primers DfmI227R: Seite 113

Tabelle I.12: Spezifität des Primers Dfm58F: Seite 113

Tabelle I.13: Spezifität des Primers DfmI129R: Seite 114

Tabelle I.14: Informationen betreffend Klon_149: Seite 114

Tabelle I.15: Übersicht über die Zahlenwerte der Inkubationen JV-2 und S4: Seite 115

Für die Tabellen I.2, I.3, I.4, I.6, I.7, I.8 werden folgende Abkürzungen verwendet:

Query cov.: Die „Query coverage“ gibt die Sequenzlänge der Suchsequenz in Prozent an, die eine Übereinstimmung mit der Sequenz im Ergebnis zeigt.

Max. ident.: Die „Maximum identity“ gibt die Ähnlichkeit der Suchsequenz zur Referenzsequenz in Prozent an.

Tabelle I.1: Übersicht über die Zuordnung der Sequenzen der DsrAB-Datenbank zu den jeweiligen OTUs (90 % Sequenzähnlichkeit) für Nuklein- und Aminosäuren. Für die grau unterlegten Sequenzen wurde eine Vollsequenz erstellt.

OTU ¹	Nukleinsäuren	Aminosäuren
	Namen der Sequenzen ²	
1	1_17, 4_16, 3_20, 2_25	1_20, 4_26, 5_9, 3_27, 1_17, 4_16, 3_20, 2_25, 5_7, 4_1
2	5_7, 4_1, 1_20, 4_26, 3_27, 5_9	2_11, 2_19, 4_25, 4_9, 3_17, 3_19, 4_17, 1_21, 1_32, 3_26, 4_12, 3_29, 4_18, 5_3, 3_22, 4_3, 4_4, 4_19, 1_8
3	1_21, 5_3, 1_32, 3_26, 3_22, 4_12, 3_29, 4_18, 1_8, 4_3, 4_4, 4_19, 2_11, 2_19, 4_17, 4_25, 4_9, 3_19, 3_17	1_14
4	1_14	2_13
5	2_13	1_22, 1_29
6	1_22, 1_29	3_10
7	3_10	5_13, 3_25
8	5_13, 3_25	5_16, 5_5
9	5_16, 5_5	4_11, 4_22, 5_8, 3_6, 3_24, 2_24, 5_11
10	2_24	2_23
11	5_11	4_27, 5_15, 3_16, 4_13
12	4_11, 4_22, 5_8, 3_6, 3_24	1_3
13	2_23	2_7, 2_2, 1_13
14	4_13, 4_27, 5_15, 3_16	5_18
15	1_3	-
16	2_2, 1_13, 2_7	-
17	5_18	-

¹ Anmerkung: Die Nummerierung der OTUs der Nuklein- und Aminosäuren stehen in keinem Zusammenhang zueinander und sind in dieser Tabelle aus Gründen der Einfachheit nebeneinander dargestellt.

² Die Sequenzen sind unter diesem Namen mit Voranstellung der Buchstaben HA in der DsrAB-Genbank zu finden.

Tabelle I.2: Sequenzähnlichkeit der *dsrAB*-Vollsequenzen der Station HA zu den nächsten Verwandten in zwei, bzw. drei Habitaten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: September 2009)

OTU	Sequenz-name	Query Cov.	Max. ident	Referenzorganismus		
				Name	Zugang	Habitat
1	1_17full	99 %	99 %	Klon NTd-I117 (Kaneko 2007)	AB263141	Tiefseesediment
		97 %	86 %	Olavius algarvensis Delta 1 endosymbiont clone (Ruehland nicht publiziert)	DQ058665	Mariner Oligochaet
2	4_1full	95 %	92 %	Klon EBext-44 (Giloteaus nicht publiziert)	FM212321	Umweltprobe
		98 %	89 %	Olavius crassitunicatus Delta 1 endosymbiont (Ruehland nicht publiziert)	DQ058668	Mariner Oligochaet
3	5_3full	99 %	88 %	Klon NTd-I24 (Kaneko 2007)	AB263148	Tiefseesediment
		99 %	84 %	Klon LGWG04 (Wu 2009)	EF065030	verschmutztes Meerwasser
4	1_14full	45 %	99 %	Klon 40H-0D-35 (Zhang, nicht publiziert)	FJ403793	Umweltprobe
		99 %	81 %	Klon MAF28G (Wagner, nicht publiziert)	AY865326	Umweltprobe
5	2_13full	99 %	80 %	Klon NTd-IV01 (Kaneko 2007)	AB263165	Tiefseesediment
		99 %	77 %	Klon LGWG23 (Wu 2009)	EF065033	verschmutztes

						Meerwasser
6	1_22full	99 %	80 %	Klon MAF17G (Wagner, nicht publiziert)	AY865325	Umweltprobe
		95 %	80 %	Klon PIMO3F05 (Bahr 2005)	AY741576	Salzsumpf
7	3_10full	99 %	96 %	Klon B01P021 (Dhillon 2003)	AY197431	Guaymas Becken
		99 %	96 %	Klon NTd-II01 (Kaneko 2007)	AB263152	Tiefseesediment
8	3_25full	99 %	94 %	Klon VN8 (Leloup 2006)	AY953400	Schlamm- matte aus der Seine- Mündung
		53 %	78 %	Klon LGWK03 (Wu 2009)	EF065067	verschmutztes Meerwasser
9	5_16full	78 %	76 %	Klon DSR-II-2 (Leloup 2009)	FM179956	Aarhus Bay
		55 %	77 %	Klon LGWK16 (Wu 2009)	EF065069	verschmutztes Meerwasser
10	2_24full	98 %	88 %	Klon VN5 (Leloup 2009)	AY953397	Aarhus Bay
		99 %	79 %	Klon VHS033 (Zhang 2008)	DQ112203	verschmutztes Hafensediment
11	5_11full	99 %	94 %	Klon VN8 (Leloup 2006)	AY953400	Aarhus Bay
		98 %	87 %	Klon VN5 (Leloup 2009)	AY953397	Aarhus Bay
12	3_24full	95 %	97 %	Klon DSR-III-6 (Leloup 2009)	FM179967	Aarhus Bay
		96 %	90 %	Klon PIMO2A11 (Bahr 2005)	AY741563	Salzsumpf
13	2_23full	95 %	93 %	Klon DSR-III-6 (Leloup 2009)	FM179967	Aarhus Bay
		96 %	91 %	Klon PIMO2A11 (Bahr 2005)	AY741563	Salzsumpf
14	4_13full	99 %	86 %	Klon VHS032 (Zhang 2008)	DQ112202	verschmutztes Hafensediment
		99 %	83 %	Klon NTd-VIII (Kaneko 2007)	AB263183	Tiefseesediment
15	1_3full	50 %	99 %	Klon 40H-180D-1 (Zhang, nicht publiziert)	FJ403923	Okhotsk Meer
		31 %	71 %	Klon DSR-D (Nercessian 2005)	AY354078	hydrothermale Tiefseequelle
16	2_7full	99 %	89 %	Klon VN8 (Leloup 2006)	AY953400	Aarhus Bay
		99 %	74 %	Klon LGWG09 (Wu 2009)	EF065041	verschmutztes Meerwasser
17	5_18full	96 %	96 %	Klon DSR-III-2 (Leloup 2009)	FM179963	Aarhus Bay
		99 %	86 %	Klon NTd-V03 (Kaneko 2007)	AB263174	Tiefseesediment
4	4_27full ²	50 %	98 %	Klon 40H-180D-1 (Zhang, nicht publiziert)	FJ403923	Okhotsk Meer
16	1_13full	99 %	83 %	Klon NTd-V07 (Kaneko 2007)	AB263178	Tiefseesediment
		99 %	82 %	Klon fosws7f8 (Mussmann 2005b)	CT025836	-

Tabelle I.3: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen, welche nach 20 Stunden Inkubation von arktischem Sediment bei 50 °C isoliert wurden zu den nächsten Verwandten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: Oktober 2009)

OTU	Name	urspr. Name	Query cov.	Max. ident.	Referenzorganismus		
					Name	Zugang	Habitat
1	p1_1	CHU_117_B14	100%	88%	Klon UH1 (Paidisetti nicht publiziert)	DQ297965	Hydrocarbon verunreinigter Boden
2	p1_2	CHU_120_H14	94%	99%	Klon DSS5 (Ravenschlag 2000)	AF233494	marines arktisches Sediment
	p1_56	CHU_187_N18	94%	98%			
3	p1_3	CHU_121_J14	100%	99%	Klon SK1 (Mussmann 2005)	AY771952	Schlammmatte, Wadden Meer
4	p1_4	CHU_122_L14	84%	99%	Tepidibacter formicigenes (Urios 2004)	AY245527	marine hydrothermale Quelle
	p1_8	CHU_126_D16	84%	99%			
	p1_23	CHU_141_A19	84%	99%			
	p1_26	CHU_145_I19	84%	99%			
	p1_31	CHU_153_J17	84%	98%			
	p1_34	CHU_157_B19	84%	99%			
	p1_58	CHU_190_D20	84%	99%			
5	p1_5	CHU_123_N14	100%	98%	Klon GoM (Martinez 2006)	AY542564	Schlammvulkan, Golf von Mexiko
	p1_24	CHU_142_C19	100%	97%	Klon GoM161_Bac65 (Martinez 2006)	AM745158	kaltes Sediment, Golf von Mexiko
6	p1_6	CHU_124_914	99%	92%	Klon DOK_BIODYN_555 (Hartmann 2006)	DQ828207	Erdprobe
7	p1_7	CHU_125_B16	100%	99%	Klon Fe_B_123 16S, methanoxidierend (Beal nicht publiziert)	GQ356940	marines Sediment
	p1_68	CHU_201_I21	100%	99%	Klon 157I22 (Zeng nicht publiziert)	EU925919	Sediment, Beringmeer
8	p1_9	CHU_127_F16	100%	99%	Klon boHTK-106 (Gao nicht publiziert)	FJ873347	methanhaltiges Tiefseesediment, Okhotsk Meer
	p1_55	CHU_186_L18	100%	100%			
	p1_66	CHU_199_E21	100%	99%			
	p1_70	CHU_203_M21	100%	100%			
9	p1_10	CHU_129_J16	100%	97%	Klon d51 (Zeng nicht publiziert)	GQ850559	Beringmeer
10	p1_11	CHU_130_L16	100%	97%	Klon Dan_Bac48 (Gittel nicht publiziert)	FN356255	hoch temperierte Ölförderungsanlage
	p1_37	CHU_160_H19	100%	97%			
	p1_43	CHU_168_G18	99%	97%			
	p1_64	CHU_197_A21	100%	97%			
	p1_52	CHU_183_F18	100%	97%			
11	p1_13	CHU_131_N16	99%	99%	Klon C1_B038 (Teske 2002)	AF420367	hydro-thermales Sediment, Guaymas Becken
	p1_25	CHU_143_E19	99%	99%			

	p1_15	CHU_133_A17	100%	98%	Klon CS038 (Cho nicht publiziert)	AY279074	kaltes Sediment
12	p1_14	CHU_132_P16	94%	88%	Klon SGSH561 (Walsh nicht publiziert)	GQ347505	Sauerstoff- hältiges Sediment
13	p1_16	CHU_134_C17	99%	98%	Klon RH.204i-50-73 (Ben-Dov 2006)	DQ458465	Umweltprobe
	p1_81	CHU_155_cut	100%	99%			
14	p1_18	CHU_136_G17	100%	98%	Klon S2-73 (Zhao nicht publiziert)	FJ545586	Gelbes Meer
	p1_60	CHU_193_J20	100%	98%			
15	p1_20	CHU_138_K17	100%	92%	Klon 33mos_20s_E1 (Goffredi nicht publiziert)	GQ261844	Tiefsee
16	p1_22	CHU_140_O17	100%	99%	Klon d81 (Zeng nicht publiziert)	GQ850565	Beringmeer
	p1_38	CHU_162_L19	100%	99%	Klon bOHTK-62 (Gao nicht publiziert)	FJ873303	methanhältiges Tiefsee- sediment, Okhotsk Meer
	p1_47	CHU_176_G20	100%	98%			
17	p1_27	CHU_147_M19	100%	99%	Klon b25b (Zeng nicht publiziert)	GQ472802	Beringmeer
18	p1_28	CHU_149_B17	99%	93%	Klon 080213-ABM-Ibeco Seal 8-74 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732643	-
	p1_35	CHU_158_D19	99%	92%			
	p1_36	CHU_159_F19	100%	92%			
	p1_42	CHU_167_E18	99%	92%			
	p1_44	CHU_171_M18	99%	93%			
	p1_57	CHU_188_P18	100%	93%			
	p1_61	CHU_194_L20	98%	93%			
19	p1_29	CHU_151_F17	99%	92%	Klon CD5F2 (Frias-Lopez 2002)	AY038415	Marine Probe
20	p1_30	CHU_152_H17	100%	99%	Klon GoM GB425 02B-96 (Martinez 2006)	AY542562	Schlamm- vulkan, Golf von Mexiko
21	p1_32	CHU_154_L17	99%	93%	Klon KorMud-V6C104 (Cho nicht publiziert)	DQ112506	Schlamm- sediment
22	p1_39	CHU_164_P19	99%	90%	Klon AKYG1106 (Tringe 2005)	AY921951	Umweltprobe
23	p1_40	CHU_165_A18	89%	77%	Klon 06PS085 (Rott nicht publiziert)	EU086529	-
24	p1_41	CHU_166_C18	100%	92%	Klon SSS85N (Dillon nicht publiziert)	EU592454	aquatische Umweltprobe
25	p1_45	CHU_173_A20	100%	97%	Klon D39 (Köchling nicht publiziert)	GQ249581	anaerobes marines Sediment, Cadiz
	p1_48	CHU_178_K20	100%	99%	Klon FeOrig_B_122 (Beal nicht publiziert)	GQ357030	marines methanhältiges Sediment
	p1_69	CHU_202_K21	100%	99%			
	p1_76	CHU_211_M23	100%	99%			
26	p1_46	CHU_174_C20	100%	97%	Klon Crozet_s_212 (Malinowska nicht publiziert)	FM213693	Sediment, Indischer Ozean
	p1_78	CHU_212_O23	100%	97%			
27	p1_49	CHU_179_M20	99%	99%	Klon sediment_surface4 (Arnosti nicht publiziert)	GQ259314	marine Wasserprobe vor Svalbard
28	p1_50	CHU_181_B18	100%	99%	Klon S11-46 (Li 2009)	EU287229	Sediment, pazifischer arkt. Ozean

	p1_72	CHU_206_C23	100%	99%	Klon Fe_B_145 (Beal nicht publiziert)	GQ35696	marines methanhaltiges Sediment
	p1_73	CHU_208_G23	100%	100%	Klon s5_8_II_27 (Hubert 2009)	FN396751	marines arktisches Sediment
29	p1_51	CHU_182_D18	100%	99%	Klon bOHTK-94 (Gao nicht publiziert)	FJ873332	methanhaltiges Tiefsee- sediment, Okhotsk Meer
30	p1_53	CHU_184_H18	100%	95%	Klon JH10_C27 (Gho nicht publiziert)	AY568784	Watt auf der Insel Ganghwa
31	p1_54	CHU_185_J18	100%	98%	Klon v1t44 (Duperron nicht publiziert)	FM165274	Tubus vesti- mentiferan
32	p1_62	CHU_195_N20	100%	99%	Klon Tomm05_1274_3_Bac40 (Wegener 2008)	FM179829	methanhaltige Aussickerung von Bohrinseln
33	p1_63	CHU_196_P20	99%	95%	Klon Belgica2005/10-140-21 (Gillan 2007)	DQ351794	schwermetall- haltiges marines Sediment
34	p1_71	CHU_204_O21	100%	98%	Klon KZNMV-25-B56 (Kormas nicht publiziert)	FJ712589	Schlamm- vulkan, Mittelmeer
35	p1_74	CHU_209_I23	100%	99%	Klon Tomm05_1274_3_Bac88 (Wegener 2008)	FM179845	methanhaltige Aussickerung von Bohrinseln
36	p1_75	CHU_210_K23	100%	92%	Klon CL4.E421 (Cousin nicht publiziert)	FM176214	Tubus Tiefseewürmer
37	p1_77	CHU_211_M23	100%	99%	Klon s104 (Zeng nicht publiziert)	EU919850	Wasserprobe, Kongsfjorden, Svalbard
38	p1_79	CHU_119_cut	100%	99%	Klon 237b2 (Edlund 2008)	EF459930	Baltisches Meer
39	p1_80	CHU_137_cut	100%	99%	Klon 916-U-41 (Jiang nicht publiziert)	EU438330	marines Sediment

Tabelle I.4: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen, welche nach 80 Stunden Inkubation von arktischem Sediment bei 50 °C isoliert wurden zu den nächsten Verwandten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: Oktober 2009)

OTU	Name	urspr. Name	Query Cov.	Max ident.	Referenzorganismus		
					Name	Zugang	Habitat
1	p2_1	CHU_225_J23	98%	95%	Klon d81 (Zeng nicht publiziert)	GQ850565	Beringmeer
2	p2_2	CHU_226_L23	99%	99%	Klon Tomm05_1274_3_Bac88 (Wegener 2008)	FM179845	methanhaltige Aussickerung von Bohrinseln
3	p2_3	CHU_228_P23	99%	95%	Desulfotomaculum thermosapovorans (Fardeau 1995)	Z26315	-
	p2_8	CHU_234_K22	98%	94%			
	p2_10	CHU_213_B21	98%	95%			
	p2_11	CHU_237_A24	95%	95%			
	p2_14	CHU_242_K24	100%	95%			
	p2_15	CHU_244_O24	100%	95%			
	p2_16	CHU_245_B22	99%	95%			
	p2_17	CHU_248_H22	98%	95%			
	p2_18	CHU_249_J22	98%	95%			

	p2_20	CHU_252_P22	100%	94%			
	p2_24	CHU_258_L24	100%	95%			
	p2_28	CHU_265_I01	99%	95%			
	p2_34	CHU_273_I03	99%	95%			
	p2_37	CHU_276_O03	100%	95%			
	p2_48	CHU_292_P03	100%	95%			
	p2_57	CHU_222_D23	100%	95%			
	p2_58	CHU_278_D01	100%	92%			
4	p2_4	CHU_229_A22	99%	98%	Klon 051E87 (Zeng nicht publiziert)	EU925856	Beringmeer
5	p2_5	CHU_230_C22	98%	99%	Klon FeOrig_B_122 (Beal nicht publiziert)	GQ357030	methanhaltiges marines Sediment
6	p2_6	CHU_231_E22	86%	94%	Klon BF.S3 (Cousin nicht publiziert)	FM175080	Tuffstein- haltiges Sediment
7	p2_7	CHU_233_I22	98%	92%	Klon RH.204i-34 (Ben-Dov 2006)	DQ458394	Umweltprobe
8	p2_9	CHU_235_M22	100%	99%	Sva0318 (Ravenschlag 1999)	AJ240989	marines Sediment vor Svalbard
9	p2_12	CHU_240_G24	100%	94%	Klon CK_2C3_6 (Green-Garcia nicht publiziert)	EU488144	Symbiont, zweischaliges Krustentier
10	p2_13	CHU_241_I24	98%	98%	Klon RH.204i-50-73 (Ben-Dov 2006)	DQ458465	Umweltprobe
	p2_38	CHU_277_B01	97%	98%			
	p2_40	CHU_282_L01	99%	98%			
	p2_41	CHU_285_B03	98%	99%			
	p2_42	CHU_286_D03	97%	98%			
	p2_55	CHU_219_N21	100%	98%			
11	p2_19	CHU_250_L22	100%	95%	Klon Belgica2005/10-ZG-6 (Gillan 2007)	DQ351802	schwermetall- haltiges marines Sediment
12	p2_21	CHU_253_B24	100%	99%	Klon 111N77 (Zeng nicht publiziert)	FJ416122	Beringmeer
13	p2_22	CHU_256_H24	100%	99%	Klon Belgica2005/10-130-7 (Gillan 2007)	DQ351755	schwermetall- haltiges marines Sediment
14	p2_23	CHU_257-J24	95%	98%	Klon 56EDB2 (Paisse 2008)	AM882624	küstennahes marines Sediment
	p2_47	CHU_291_N03	99%	98%	Klon D9_10.4_2 (Ashforth nicht publiziert)	FJ717003	Umweltprobe
15	p2_25	CHU_215_F21	100%	98%	Klon 157I22 (Zeng nicht publiziert)	EU925919	Beringmeer
	p2_53	CHU_227_N23	99%	98%			
16	p2_26	CHU_260_P24	94%	92%	Klon DOK_NOFERT_390 (Hartmann 2006)	DQ829338	Bodenprobe
17	p2_27	CHU_263_E01	100%	95%	Klon FL0428B_PF3 (Macalady nicht publiziert)	FJ716454	Biofilm
18	p2_29	CHU_267_M01	98%	93%	Clostridium purinolyticum (Woese nicht publiziert)	M60491	-

19	p2_30	CHU_268_O01	100%	97%	Klon SI29 (Mussmann 2005)	AY771939	Schlamm- probe, Waddenmeer
20	p2_31	CHU_269_A03	91%	98%	Klon MD2898-B8 (Li nicht publiziert)	EU386052	marines Sediment, Südchina
21	p2_32	CHU_270_C03	100%	99%	Klon b29 (Zeng nicht publiziert)	GQ472812	Beringmeer
22	p2_33	CHU_272_G03	99%	98%	Klon GL1-24 (Dang 2008)	EF215724	küstennahes marines Sediment
23	p2_35	CHU_274_K03	100%	97%	Klon Sva0503 (Ravenschlag 1999)	AJ241009	kaltes marines Sediment
24	p2_36	CHU_216_H21	99%	97%	Klon Dan_Bac48 (Gittel nicht publiziert)	FN356255	hoch- temperierte Ölförderungs- anlage
	p2_49	CHU_293_A02	99%	97%			
	p2_54	CHU_218_L21	98%	97%	Klon Dan_Bac87 (Gittel nicht publiziert)	FN356293	
25	p2_39	CHU_279_F01	84%	99%	Tepidibacter formicigenes (Urios 2004)	AY245527	hydro-thermale Quelle, Atlantik
26	p2_43	CHU_287_F03	100%	99%	Klon bOHTK-62 (Gao nicht publiziert)	FJ873303	methanhaltiges kaltes Sediment, Okhotsk-Meer
	p2_56	CHU_221_B23	99%	98%			
	p2_45	CHU_289_J03	99%	98%	Klon d81 (Zeng nicht publiziert)	GQ850565	Beringmeer
27	p2_51	CHU_295_E02	99%	99%	Klon 038 (Teske 2002)	AF420367	hydro- thermales Sediment, Guaymas- Becken
	p2_44	CHU_288_G03	99%	99%			
28	p2_46	CHU_290_L03	100%	99%	Klon Sva0389 (Ravenschlag 1999)	AJ240976	kaltes marines Sediment
29	p2_50	CHU_294_C02	100%	97%	Klon Crozet_s_212 (Malinowska nicht publiziert)	FM213693	Indischer Ozean
30	p2_52	CHU_296_G02	100%	99%	Klon 12CSRZ-B21 (Webster nicht publiziert)	FN424329	Gezeiten geprägtes Sediment, Severn Fluss- mündung

Tabelle I.5: Auflistung der OTUs der beiden Genbanken (20 und 80 Stunden Inkubation), welche zueinander eine Sequenzähnlichkeit von 99 % aufweisen und ein gemeinsames OTU bilden würden.

OTUs 20 Stunden Inkubation	OTUs 80 Stunden Inkubation
4	25
10	24
11	27
13	10
16	26
20	28
25	5
26	29
32	32
35	2

Tabelle I.6: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen welche mittels DGGE-Analyse isoliert wurden zu den nächsten Verwandten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: November 2009)

OTU	Sequenzname	Query Cov.	Max. ident:	Referenzorganismus		
				Name	Zugang	Habitat
1	0_1_2007-03-27_H09	98%	90%	Klon s5_0_VII_24 (Hubert 2009)	FN396615	arktisches marines Sediment, Svalbard
2	0_2_2007-03-27_G09	100%	92%	Klon BAC_OG47 16S (Sapp nicht publiziert)	FJ824896	Nordsee
3	1_1_2007-03-27_F09	98%	99%	Klon s5_8_I_8 (Hubert 2009)	FN396790	arktisches marines Sediment, Svalbard
	2_3_2007-03-27_H10	98%	99%			
	8_3b_0104_2007-04-02_C07	99%	98%			
4	1_2_2007-03-27_E09	98%	96%	Klon s5_8_I_8 (Hubert 2009)	FN396790	arktisches marines Sediment, Svalbard
5	1_3_2007-03-27_D09	98%	100%	Klon s5_8_I_8 (Hubert 2009)	FN396790	arktisches marines Sediment, Svalbard
	2_4_2007-03-27_G10	100%	100%			
	3_3_2007-03-27_D10	100%	100%			
	7_3_2007-03-27_H11	100%	99%			
	1_2b_3003_2007-04-01_C02	100%	100%			
	1_3b_0104_2007-04-01_C01	100%	100%			
	1_3b_3003_2007-04-01_B02	100%	100%			
	1_4b_0104_2007-04-01_B01	100%	99%			
	1_4b_3003_2007-04-01_A02	100%	99%			
	2_1b_0104_2007-04-01_A01	100%	100%			
	2_1b_0104_2007-04-02_A05	100%	100%			
	3_3b_0104_2007-04-02_D06	100%	100%			
	7_3b_0104_2007-04-02_G07	100%	100%			
	9_1c_2007-04-04_H01	100%	100%			
	8_4b_0104_2007-04-02_B07	97%	100%			
	1_2b_0104_2007-04-01_D01	100%	99%			
	3_2_2007-03-27_E10	100%	99%			
	7_2_2007-03-27_A10	100%	99%			
	2_2_2007-03-27_A09	98%	98%			
6	1_4_2007-03-27_C09	99%	99%	Klon s5_8_I_8 (Hubert 2009)	FN396790	arktisches marines Sediment, Svalbard
7	2_1_2007-03-27_B09	98%	97%	Klon s5_8_I_8 (Hubert 2009)	FN396790	arktisches marines Sediment, Svalbard
8	3_1_2007-03-27_F10	99%	94%	Klon 080214-ABM-MX80 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732650	Anreicherung aus Bentonit-Puffer bei 20 und 50 °C
9	5_1_2007-03-27_C10	99%	95%			
	10_3c_2007-04-04_E01	99%	95%			
	10_4c_2007-04-04_D01	99%	95%			
	8_2_2007-03-27_F11	99%	95%			
	10_5c_2007-04-04_C01	99%	94%			
	10_4b_0104_2007-04-02_D08	99%	95%			
	10_4b_0204R_2007-04-02_D05	100%	95%			
10	8_3_2007-03-27_E11	100%	96%	Klon 47mm70 (Milleson nicht publiziert)	AY796047	Bohrloch einer Goldmine, Südafrika
	10_2b_0104_2007-04-02_F08	100%	99%			
	10_2c_2007-04-04_F01	100%	97%			

11	0_1b_0104_2007-04-01_H01	100%	92%	Klon s5_0_VII_24. (Hubert 2009)	FN396615	arktisches marines Sediment, Svalbard
	0_1b_3003_2007-04-01_G02	100%	93%			
12	0_2b_0104_2007-04-01_G01	73%	92%	Klon Ld1-37 (Zhao nicht publiziert)	GQ246432	marines Sediment, Gelbes Meer, China
13	0_2b_3003_2007-04-01_F02	80%	91%	Klon Ld1-37 (Zhao nicht publiziert)	GQ246432	marines Sediment, Gelbes Meer, China
14	0_3b_0104_2007-04-01_F01	99%	92%	Klon d2 (Zeng nicht publiziert)	GQ472819	Sediment, Beringmeer
	0_3b_3003_2007-04-01_E02	99%	92%			
15	10_1b_0104_2007-04-02_G08	98%	93%	Klon 47mm70 (Milleson nicht publiziert)	AY796047	Bohrloch einer Goldmiese, Südafrika
16	10_1b_0204R_2007-04-02_G05	100%	91%			
17	10_2b_0204R_2007-04-02_F05	97%	95%			
18	10_3b_0104_2007-04-02_E08	99%	93%	Klon 080213-ABM-Ikosorb 4-42 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732631	Anreicherung aus Bentonit-Puffer bei 20 und 50 °C
	10_3b_0204R_2007-04-02_E05	98%	93%			
19	1_1b_0104_2007-04-01_E01	97%	95%	Klon b29 (Zeng nicht publiziert)	GQ472812	Sediment, Beringmeer
20	1_1b_3003_2007-04-01_D02	96%	98%	Klon Amsterdam-1B-57 (Heijs nicht publiziert)	AY592358	Schlammvulkan, Tiefsee, Mittelmeer
	7_1b_0104_2007-04-02_A06	99%	99%			
	8_1b_0104_2007-04-02_E07	98%	99%			
21	3_1b_0104_2007-04-02_F06	100%	96%	Klon Amsterdam-1B-57 (Heijs nicht publiziert)	AY592358	Schlammvulkan, Tiefsee, Mittelmeer
22	3_2b_0104_2007-04-02_E06	98%	89%	Klon GoM GB425 (Martinez 2006)	AY542561	Schlammvulkan, Golf von Mexiko
23	3_4b_0104_2007-04-02_C06	95%	91%	Klon 080213-ABM-Ikosorb 4-42 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732631	Anreicherung aus Bentonit-Puffer bei 20 und 50 °C
24	7_4b_0104_2007-04-02_F07	99%	84%	Klon Dan_Bac61 (Gittel 2009)	FN356268	hochtemperiertes Ölreservoir
25	8_2b_0104_2007-04-02_D07	100%	88%	Klon 096B62 (Zeng nicht publiziert)	EU735002	Sediment, Beringmeer
26	8_6b_0104_2007-04-02_H08	95%	85%	Klon s5_8_I_7 (Hubert 2009)	FN396789	arktisches marines Sediment, Svalbard
27	8_6b_0204R_2007-04-02_H05	97%	82%	Klon Mothra_B2-26 (Ye nicht publiziert)	GQ267134	Mothra-Sediment, Juan de Fuca
28	10_6c_2007-04-04_B01	100%	99%	Klon AKIW649 (Brodie nicht publiziert)	DQ129399	urbanes Aerosol

Tabelle I.7: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen welche mittels nested PCR und anschließender DGGE-Analyse isoliert wurden zu den nächsten Verwandten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: November 2009)

OTU	Sequenzname	Query Cov.	Max. Ident.	Referenzorganismus		
				Name	Zugang	Habitat
1	7_1d_2007-04-19_H05	100%	92%	Desulfotomaculum sapomandens strain DSM 3223 (Kuever 1999)	NR_025026	-
2	7_2d_2007-04-19_G05	89%	92%	Klon 080213-ABM-Ikosorb 4-42 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732631	Anreicherungs-kultur aus Bentonit-Puffer
3	7_3d_2007-04-19_F05	99%	95%	Klon 080214-ABM-MX80 9-92 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732650	Anreicherungs-kultur aus Bentonit-Puffer bei 20 und 50 °C
	8_3d_2007-04-19_C05	99%	95%			
	DEM_Band_9_2007-06-08_H02	99%	95%			
	DEM_Band_20_2007-06-08_E03	99%	95%			
	DEM_Band_22_2007-06-08_C03	99%	95%			
	DEM_Band_8_2007-06-08_A01	99%	95%			
	DEM_Band_10_2007-06-08_G02	99%	95%			
	DEM_Band_1_2007-06-08_H01	99%	95%			
	DEM_Band_14_2007-06-08_C02	99%	95%			
	DEM_Band_15_2007-06-08_B02	99%	95%			
	DEM_Band_21_2007-06-08_D03	99%	95%			
	DEM_Band_2_2007-06-08_G01	99%	95%			
	DEM_Band_3_2007-06-08_F01	99%	95%			
	DEM_Band_4_2007-06-08_E01	99%	95%			
	DEM_Band_19_2007-06-08_F03	98%	95%			
4	8_1d_2007-04-19_E05	100%	96%	D.thermosapovorans (Stackebrandt 1997)	Y11575	-
	DEM_Band_5_2007-06-08_D01	100%	96%			
	DEM_Band_12_2007-06-08_E02	100%	96%			
	DEM_Band_13_2007-06-08_D02	100%	96%			
	DEM_Band_16_2007-06-08_A02	100%	96%			
	DEM_Band_6_2007-06-08_C01	100%	96%			
	DEM_Band_7_2007-06-08_B01	100%	96%			
5	8_2d_2007-04-19_D05	100%	88%	Klon TJ-2 (Imachi 2006)	AB154374	-
6	DEM_Band_17_2007-06-08_H03	100%	99%	Desulfotomaculum thermobenzoicum (Tasaki 1991)	AJ294429	-
	DEM_Band_18_2007-06-08_G03	100%	96%			

Tabelle I.8: Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS-Sequenzen, welche mittels dem Primerpaar DEM116F/DEM1164R direkt aus arktischem Sediment isoliert wurden zu den nächsten Verwandten ermittelt mit dem Datensuchprogramm „BLAST“. (Stand: November 2009)

OTU	Sequenz-name	Query Cov.	Max. ident	Referenzorganismus		
				Name	Zugang	Habitat
1	dma15	100%	99%	Desulfotomaculum arcticum (Vandieken 2006)	DQ148942	Svalbard
2	DEM1	100%	95%	Desulfotomaculum thermosapovorans (Stackebrandt 1997)	Y11575	
	DEM15	100%	96%			
3	DEM2	100%	92%	Desulfotomaculum halophilum (Tardy-Jacquenod 1998)	NR_026061	Ölproduktions- system
	DEM3	100%	91%			
	DEM10	100%	91%			
	DEM11	100%	91%			
	DEM12	100%	91%			
	DEM14	100%	91%			
	DEM17	100%	91%			
	DEM19	100%	91%			
4	DEM24	100%	91%	Desulfotomaculum sp. Lac2 (Kjeldsen 2007)	DQ386219	hypersalines Sediment, Great Salt Lake, Utah
	DEM13	100%	93%			
	DEM20	100%	93%			
	DEM22	100%	93%			
	DEM23	100%	93%			
	DEM5	100%	93%			
	DEM8	100%	93%			
	DEM4	100%	93%			
	DEM16	100%	93%			
	DEM18	100%	93%			
	DEM25	100%	93%			
	DEM29	100%	93%			
	DEM38	100%	93%			
	DEM33	100%	93%			
	DEM27	100%	93%			
	DEM30	100%	93%			
	DEM6	100%	92%			
	DEM41	100%	93%			
	DEM37	100%	93%			
5	DEM21	100%	95%	Desulfotomaculum aeronauticum (Hagenauer 1997)	NR_026348	Metallegierung Flugzeug
6	DEM7	100%	91%	Desulfotomaculum halophilum (Tardy-Jacquenod 1998)	NR_026061	Ölproduktions- system
	DEM9	100%	91%			
	DEM26	100%	91%			
	DEM28	100%	91%			
	DEM31	100%	91%			
	DEM34	100%	91%			
	DEM35	100%	91%			
	DEM36	100%	91%			
	Dfm9	99%	93%			
	Dfm17	99%	93%			
	Dfm20	99%	93%			
	Dfm21	99%	93%			

Tabelle I.9: Übersicht über die zur DGGE- Analyse verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C] ¹	Referenz
C 341 ²	CC TAC GGG AGG CAG CAG	65 - 55	Muyzer und Smalla 1998
907R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT		Muyzer et al. 1993

¹ optimale Annealing-Temperatur² "GC-clamp" am 5' Ende des Primers: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'

Tabelle I.10:

Spezifität des Primers DEM116F (gtaacgcgtggataacct)	Prozent
Domäne Archaea (4/51803)	0
Phylum Euryarchaeota (4/30194)	0
Domäne Bacteria (6541/1183119)	0,6
Phylum Aquificae (1/1477)	0,1
Phylum Cyanobacteria (1/26997)	0
Phylum Proteobacteria (1236/380841)	0,3
Phylum Firmicutes (5093/331971)	1,5
Klasse "Bacilli" (46/117726)	0
Ordnung Bacillales (27/63740)	0
Familie "Staphylococcaceae" (27/27856)	0,1
Ordnung "Lactobacillales" (19/53405)	0
Familie "Leuconostocaceae" (1/1878)	0,1
Familie Streptococcaceae (17/19669)	0,1
unklassifizierte "Lactobacillales" (1/1083)	0
Klasse "Clostridia" (5036/196976)	2,6
Ordnung Clostridiales (4924/190602)	2,6
Familie Clostridiaceae (4/10617)	0
Familie "Eubacteriaceae" (1/606)	0,2
Familie "Heliobacteriaceae" (26/31)	83,9
Familie "Lachnospiraceae" (4180/84493)	4,9
Familie Peptococcaceae (443/1817)	24,4
Unterfamilie Peptococcaceae 1 (63/875)	7,2
Gattung Peptococcus (2/86)	2,3
Gattung Desulfotobacterium (45/123)	36,6
Gattung Desulfonisporea (9/34)	26,5
unklassifizierte Peptococcaceae 1 (7/196)	3,6
Unterfamilie Peptococcaceae 2 (377/619)	60,9
Gattung Cryptanaerobacter (21/61)	34,4
Gattung Desulfotomaculum (82/127)	64,6
Gattung Pelotomaculum (95/165)	57,6
Gattung Sporotomaculum (15/19)	78,9
unklassifizierte Peptococcaceae 2 (164/247)	66,4
unklassifizierte Peptococcaceae (3/70)	4,3
Familie "Peptostreptococcaceae" (16/5774)	0,3
Familie "Ruminococcaceae" (40/49499)	0,1
Familie Veillonellaceae (2/9034)	0
Familie Incertae Sedis XII (1/609)	0,2
Familie Incertae Sedis XIII (1/1533)	0,1
Familie Incertae Sedis XVIII (19/1465)	1,3
unklassifizierte Clostridiales (191/19273)	1,0
Ordnung "Thermoanaerobacterales" (33/973)	3,4
Familie "Thermoanaerobacteraceae" (32/420)	7,6
Familie Thermodesulfobiaceae (1/303)	0,3

unklassifizierte "Clostridia" (79/4916)	1,6
Klasse "Erysipelotrichi" (6/9039)	0,1
unklassifizierte Firmicutes (5/8230)	0,1
Phylum Actinobacteria (6/135757)	0
Phylum Planctomycetes (7/9223)	0,1
Phylum Spirochaetes (29/4666)	0,6
Phylum Acidobacteria (119/38138)	0,3
Phylum Bacteroidetes (7/147229)	0
unklassifizierte Bacteria (42/65357)	0,1

Tabelle I.11:

Spezifität des Primers DfmI227R (tgggacgcggayccatc)	Prozent
Domäne Bacteria (664/1183119)	0,1
Phylum Proteobacteria (48/380841)	0
Phylum Firmicutes (591/331971)	0,2
Klasse "Clostridia" (559/196976)	0,2
Ordnung Clostridiales (459/190602)	0,2
Familie "Lachnospiraceae" (2/84493)	0
Familie Peptococcaceae (411/1817)	22,6
Unterfamilie Peptococcaceae 2 (408/619)	65,9
Gattung Cryptanaerobacter (19/61)	31,2
Gattung Desulfotomaculum (83/127)	65,4
Gattung Pelotomaculum (117/165)	70,9
Gattung Sporotomaculum (14/19)	73,7
unklassifizierte Peptococcaceae 2 (145/247)	58,7
unklassifizierte Peptococcaceae (3/70)	4,3
Familie "Ruminococcaceae" (1/49499)	0
Familie Veillonellaceae (1/9034)	0
unklassifizierte Clostridiales (40/19273)	0,3
Ordnung "Thermoanaerobacterales" (29/973)	3,5
Familie "Thermoanaerobacteraceae" (27/420)	7,6
Familie Thermodesulfobiaceae (1/303)	0,3
unklassifizierte "Thermoanaerobacterales" (1/21)	4,8
unklassifizierte "Clostridia" (96/4916)	2
Phylum Planctomycetes (1/9223)	0
Phylum Spirochaetes (12/4666)	0,3
unklassifizierte Bacteria (7/65357)	0

Tabelle I.12:

Spezifität des Primers Dfm58F (caagtcgaacgaaggatc)	Prozent
Domäne Bacteria (5/1183119)	0
Phylum Firmicutes (3/331971)	0
Klasse "Clostridia" (3/196976)	0
Ordnung Clostridiales (3/190602)	0
Familie "Lachnospiraceae" (3/84493)	0
unklassifizierte "Lachnospiraceae" (3/47336)	0
Phylum Acidobacteria (1/38138)	0
unklassifizierte Bacteria (1/65357)	0

Tabelle I.13:

Spezifität des Primers Dfm129R (ggcttgacaggcagatta)	Prozent
Domäne Bacteria (5/1183119)	0
Phylum Firmicutes (5/331971)	0
Klasse "Bacilli" (5/117726)	0
Ordnung Bacillales (5/63740)	0
Familie "Alicyclobacillaceae" (5/413)	1,2
Gattung Alicyclobacillus (5/286)	1,8
unkultiviertes Bacterium; F1-1; AY096142	
Alicyclobacillus contaminans; 3-A191; AB264026	
Alicyclobacillus contaminans; E-8; AB264027	
unkultiviertes Alicyclobacillus sp.; Tik 18; AM749764	
Bacillales bacterium T75; AM749783	

Tabelle I.14: 16S-rRNS-Sequenz von Klon_149, welcher als Standard für die Quantifizierung der SRM nach 20 Stunden Inkubation herangezogen wurde, mit zwei Referenzorganismen. Die grau unterlegten Stellen markieren die Bindungsstellen der Primer Dfm58F/Dfm129R.

Sequenz Klon_149 (E.coli - Position 46 – 150):				
GUGUGCUGGA	AUUCGCCCCU	CAAGUCGAAC	GAAGGAUCAG	CGAAGAAGUU
UUCGGACGGA	UUUGCUGATT	ACTTAGUGGC	GGACGGGUGA	GUAACGCGUG
GAUAAUCUGC	CUGUCAGACC	AAGGG		
Referenzorganismen				
Query Cov.	Max. ident.	Name	Zugang	Habitat
80%	92%	Bacterium enrichment culture clone 080214-ABM-MX80 9-92 (Jaegevall nicht publiziert)	EU732650	Anreicherung aus Bentonit-Puffer bei 20 und 50 °C
73%	86%	Clostridium citroniae strain RMA 16102 (Warren 2006)	DQ279737	Infektion, Mensch

Tabelle I.15: Übersicht über die Zahlenwerte der Inkubationen JV-2 und S4

Inkubation JV-2						
Zeitpunkt (h)	eingewogenes Sediment (g)	DNS-Konzentration PicoGreen (ng/μl)	Kopienzahl der allg. 16S-rRNS pro g Sediment (errechnete Zellzahl)	Kopienzahl der allg. 16S-rRNS pro 5 ng DNS (Standardabw.)	Kopienzahl der SRM (Dfm58F/Dfm129R) pro 5 ng DNS (Standardabw.)	Prozent der DNS der SRM zur allg. 16S-rRNS
0	0,2495	10,379	8,92E+07 (2,48E+07)	2,41E+06 (1,15E+05)	0	-
0p	0,2567	7,948	8,53E+07 (2,37E+07)	3,10E+06 (9,80E+04)	0	-
10	0,2449	3,746	3,95E+07 (1,10E+07)	3,46E+06 (1,64E+05)	3,54E+01 (1,70E+00)	0
20	0,2949	3,648	4,00E+07 (1,11E+07)	4,62E+06 (2,80E+04)	1,88E+03 (1,82E+02)	0,04
35	0,2614	2,238	2,06E+07 (5,72E+06)	4,61E+06 (3,53E+05)	4,05E+04 (1,65E+03)	0,9
45	0,2582	2,306	2,38E+07 (6,61E+06)	4,82E+06 (1,79E+05)	5,77E+04 (1,09E+04)	1,2
56	0,2631	2,428	2,52E+07 (7,00E+06)	4,83E+06 (3,24E+05)	4,99E+04 (6,92E+03)	1
70	0,2502	2,272	1,49E+07 (4,14E+06)	2,72E+06 (1,29E+06)	5,90E+04 (2,48E+03)	2,2
94	0,2472	1,749	1,56E+07 (4,33E+06)	5,43E+06 (4,13E+05)	6,33E+04 (3,00E+02)	1,1
Inkubation S4						
Zeitpunkt (h)	eingewogenes Sediment (g)	DNS-Konzentration PicoGreen (ng/μl)	Kopienzahl der allg. 16S-rRNS pro g Sediment (errechnete Zellzahl)	Kopienzahl der allg. 16S-rRNS pro 5 ng DNS (Standardabw.)	Kopienzahl der SRM (Dfm58F/Dfm129R) pro 5 ng DNS (Standardabw.)	Prozent der DNS der SRM zur allg. 16S-rRNS
0p	0,2105	10,226	5,58E+06 (1,55E+06)	2,35E+06 (1,28E+05)	0	-
20	0,2453	5,031	6,73E+06 (1,87E+06)	3,95E+06 (4,07E+05)	1,03E+04 (6,14E+02)	0,3
25	0,2533	3,898	2,50E+06 (6,94E+05)	2,85E+06 (2,18E+05)	2,56E+04 (5,44E+03)	0,9
35	0,2701	4,601	2,67E+06 (7,42E+05)	4,71E+06 (1,99E+05)	1,04E+05 (1,92E+04)	2,2
45	0,2309	2,968	1,31E+06 (3,64E+05)	3,56E+06 (1,53E+05)	8,19E+04 (1,20E+04)	2,3
56	0,2701	3,897	1,81E+06 (5,03E+05)	6,24E+06 (1,68E+05)	1,29E+05 (1,45E+04)	2,1
70	0,2819	4,313	2,05E+06 (5,69E+05)	4,09E+06 (1,75E+05)	6,93E+04 (4,01E+03)	1,7
82	0,2464	2,73	1,08E+06 (3,00E+05)	4,41E+06 (1,54E+05)	6,47E+04 (3,28E+03)	1,5
94	0,3482	3,875	1,20E+07 (3,33E+06)	3,76E+06 (1,45E+06)	4,26E+04 (4,68E+03)	1,1

J. Abgrenzung der Eigenleistung

Alle durchgeführten mikrobiologischen Arbeiten und Analysen wurden von der Autorin durchgeführt, sofern sie hier nicht angeführt sind.

Probennahme für die DsrAB-Datenbank: Alexander Loy

Erstellung der DsrAB-Datenbank der Station J: Ivan Barisic

Sequenzierung der *dsrAB*-Sequenzen: Christian Baranyi

Durchführung der DGGE-Analysen sowie anschließende Sequenzierung: Christian Baranyi

Die übrigen 16S-rRNS-Sequenzen wurden zur Verfügung gestellt von Mitarbeitern des Max Planck Instituts in Bremen

Herstellung der Reinkultur von *D. arcticum*: Casey Hubert, Max Planck Institut, Bremen

Probennahme sowie Durchführung der Inkubation von arktischem Sediment und anschließende biochemische Analysen: Casey Hubert, Max Planck Institut, Bremen

Austestung der optimalen Bedingungen für die qPCR für die Primer Dfm58F/Dfm129R: Cécilia Wentrup

Austestung der optimalen Bedingungen für die qPCR für die Primer DEM116F/Dfm1227R bei gleichzeitiger Anwendung mit ihren Kompetitoren: Valerie Hubalek

Nachweis zum Ausschluss einer Inhibition der qPCR durch die eingesetzte Menge an DNS: Cécilia Wentrup

Durchführung der Quantifizierung der allgemeinen 16S-rRNS-Matrizen: Cécilia Wentrup

Durchführung der Quantifizierung der SRM des ersten Anstiegs der Sulfatreduktionsrate mit den Primern Dfm58F/Dfm129R: Valerie Hubalek

Alle genannten Personen sind, bzw. waren Mitarbeiter des Instituts für Mikrobielle Ökologie an der Universität Wien, sofern nicht anders vermerkt.

K. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank folgenden Personen:

Herrn Prof. Michael Wagner, der mir die Möglichkeit gab, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu erstellen.

Meinem Betreuer Alexander Loy, dessen Tür für Fragen und Diskussionen immer offen stand, für seine menschliche Gruppenleitung.

Meiner Laborbetreuerin Doris Steger, von der ich weitaus mehr lernen durfte als ausschließlich Fachliches.

Unserem Kooperationspartner Casey Hubert vom Max Planck Institut in Bremen, dafür, dass ich an seinem Projekt mitarbeiten durfte und für seine geduldigen Antworten auf all meine Fragen.

Meiner Freundin Cécilia Wentrup für kompetente Zusammenarbeit.

Dem besten TA Christian Baranyi für all die sequenzierten Klone.

Dem gesamten DOME-Team für fachliche Diskussionen und Hilfestellungen.

Meiner Mutter und meinem früh verstorbenen Vater, welche immer hinter mir standen und früh mein naturwissenschaftliches Interesse entdeckten und zu fördern wussten.

Meinen Schwiegereltern Elisabeth und Norbert für die einmalige Unterstützung und für die unermüdliche Kinderbetreuung.

Meinem Mann Werner, für seine unendliche Geduld und Hilfe.

Meiner Tochter Helena, dafür, dass sie meine kleine Kraftquelle ist.

L. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Diana Lebherz-Eichinger
Geboren am:	13. Januar 1983
Geburtsort:	Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	verheiratet seit Juli 2007
Kinder:	eine Tochter, geboren im Mai 2008

Schulbildung und Hochschulausbildung

1989-1993	Volksschule, Wien 1040
1993-2001	Gymnasium, Wien 1040, Neusprachlicher Zweig
2001-2005	Studium der Biologie, Studienzweig Ökologie, an der Formal-und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien
Februar - Juli 2005	Studium der Molekular- und Meeresbiologie an der Vrije Universiteit Brussels
Oktober 2005	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Wien
Januar 2007	Beginn der Diplomarbeit am Institut für Mikrobielle Ökologie unter der Leitung von o.Univ.Prof.Dr. Michael Wagner und Dr. Alexander Loy
April 2009	Beendigung des zweiten Abschnittes der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Wien

Weitere im Rahmen der Diplomarbeit erlernte Methoden:

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
DNS-Microarray